

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-517156

(P2002-517156A)

(43) 公表日 平成14年6月11日 (2002.6.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7088		31/7115	
31/7115		A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 1 2 Q 1/68	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 85 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-502884  
 (86) (22) 出願日 平成10年6月5日 (1998.6.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年12月6日 (1999.12.6)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 1 1 5 7 8  
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 5 4 9 5  
 (87) 国際公開日 平成10年12月10日 (1998.12.10)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 4 8 , 7 9 3  
 (32) 優先日 平成9年6月6日 (1997.6.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

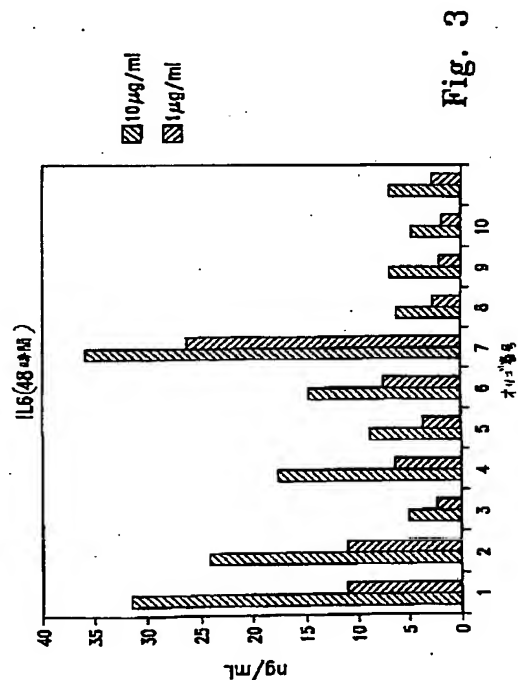
(71) 出願人 ダイナボックス テクノロジーズ コーポ  
 レーション  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,  
 サン ディエゴ, サイエンス パーク ロ  
 ード 3099, スイート 500  
 (72) 発明者 シュワルツ, デイビッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024,  
 エンシニタス, ペールダ レーン 1544  
 (72) 発明者 ロマン, マーク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,  
 ラ ホヤ, ピラ ラ ホヤ ドライブ  
 8742-33  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫刺激オリゴヌクレオチド、その組成物およびその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチド組成物に関する。これらのオリゴヌクレオチドは、免疫刺激オクタヌクレオチド配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、免疫刺激ペプチドまたは抗原と組み合わせて投与され得る。このオリゴヌクレオチドの投与に際しての免疫応答を調節するための方法もまた開示される。さらに、免疫刺激活性を有するオリゴヌクレオチドを同定するインビトロスクリーニング方法が提供される。



## 【特許請求の範囲】

1. 免疫刺激配列(ISS)を含む免疫調節オリゴヌクレオチドであって、該ISSは以下:

GACGCTCC;GACGCCCC; AGCGTTCC; AGCGCTCC; AGCGTCCC; AGCGCCCC; AACGTCCC;  
AACGCCCC; GGC GTTCC; GGC GCTCC; GGC GTCCC; GGC GCCCC; GACGCTCG; GACGTCCG;  
GACGCCCC; AGCGTTCG; AGCGTCCG; AGCGCCCC; AACGTCCG; AACGCCCC; GGC GTTCG;  
GGCGCTCG; GGC GTCCG; GGC GCCCC

からなる群より選択されるオクタヌクレオチド配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。

2. 配列番号2の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
3. 配列番号4の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
4. 配列番号1の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
5. 配列番号6の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
6. 配列番号7の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
7. 配列番号12の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
8. 配列番号15の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
9. 配列番号16の配列を含む、免疫調節オリゴヌクレオチド。
10. 前記オクタヌクレオチド配列の少なくとも1つのシトシンが、修飾されたシトシンで置換されている、請求項1に記載の免疫調節オリゴヌクレオチド。
11. 前記修飾されたシトシンが少なくともC-5までの電子吸引性基の付加を含む、請求項10に記載の免疫調節オリゴヌクレオチド。
12. 前記修飾されたシトシンが少なくともC-6までの電子吸引性基の付加を含む、請求項10に記載の免疫調節オリゴヌクレオチド。
13. 前記修飾されたシトシンが5'-ブロモシチジンである、請求項10に記載の免疫調節オリゴヌクレオチド。
14. 前記オクタヌクレオチドの5'末端から3位のCが5'-ブロモシチジンで置換されている、請求項10に記載の免疫調節オリゴヌクレオチド。
15. 前記ISSオクタヌクレオチドの5'末端から3位のCが5'-ブロモシチジン

で置換されており、そして該ISSオクタヌクレオチドの5'末端から7位のCが5'-ブロモシチジンで置換されている、請求項10に記載の免疫調節オリゴヌクレオチド。

16. 請求項1に記載の免疫調節オリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物であって、抗原をさらに含む、免疫調節組成物。

17. 前記抗原が、ペプチド、糖タンパク質、多糖類、および脂質からなる群より選択される、請求項16に記載の免疫調節組成物。

18. 前記抗原が前記免疫調節オリゴヌクレオチドに結合体化されている、請求項16に記載の免疫調節組成物。

19. 請求項1に記載の免疫調節オリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物であって、補助的刺激分子、サイトカイン、ケモカイン、標的化タンパク質リガンド、トランス活性化因子、ペプチド、および修飾されたアミノ酸を含むペプチドから

なる群より選択される促進因子をさらに含む、免疫調節組成物。

20. 前記促進因子が前記免疫調節オリゴヌクレオチドに結合体化されている、請求項19に記載の免疫調節組成物。

21. 請求項1に記載の免疫調節オリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物であって、抗原をさらに含み、アジュバントをさらに含む、免疫調節組成物。

22. 前記抗原が、ペプチド、糖タンパク質、多糖類、および脂質からなる群より選択される、請求項21に記載の免疫調節組成物。

23. 前記抗原が前記免疫調節オリゴヌクレオチドに結合体化されている、請求項21に記載の免疫調節組成物。

24. 免疫刺激配列 (ISS) および抗原を含むポリヌクレオチドを含む免疫調節組成物であって、該ISSが5'-シトシン、グアニン-3'を含み、そして該ISSと該抗原とが結合体化しておらず、そして溶液中における該ISSおよび抗原の同時投与と比較して免疫応答を増強するのに効果的な距離で近位に会合している、免疫調節組成物。

25. 前記ISSがパリンドローム領域を含み、そして該パリンドローム領域が5'-

シトシン、グアニン-3' 配列を含む、請求項24に記載の免疫調節組成物。

26. 前記ISSが5'-プリン、プリン、シトシン、グアニン、ピリミジン、ピリミジン-3' を含む、請求項25に記載の免疫調節組成物。

27. 前記ISSが以下：

AACGTT, AGCGTT, GACGTT, GCGGTT,  
AACGTC, AGCGTC, GACGTC, GCGGTC, AACGCC, AGCGCC, GACGCC, GCGGCC, AACGCT,  
AGCGCT, GACGCT, および GCGGCT.

からなる群より選択される配列を含む、請求項26に記載の免疫調節組成物。

28. 前記ISSが以下：

GACGCTCC; GACGCCCC; AGCGTTCC; AGCGCTCC; AGCGTCCC;  
AGCGCCCC; AACGTCCC; AACGCCCC; GCGGTTCC; GCGGCTCC; GCGGTCCC; GCGGCCCC;  
GACGCTCG; GACGTCCG; GACGCCCC; AGCGTTCC; AGCGTCCG; AGCGCCCC; AACGTCCG;  
AACGCCCC; GCGGTTCC; GCGGCTCG; GCGGTCCG; GCGGCCCC

からなる群より選択される、請求項26に記載の免疫調節組成物。

29. 前記ISSおよび抗原が包膜化によって近位に会合されている、請求項24に記載の免疫調節組成物。

30. 前記包膜化がリポソーム内である、請求項29に記載の免疫調節組成物。

31. 前記ISSおよび抗原が、プラットフォーム分子に結合することによって近位に会合している、請求項24に記載の免疫調節組成物。

32. 前記ISSおよび抗原が、約0.04  $\mu\text{m}$ ～約100  $\mu\text{m}$ 間での距離で近位に会合している、請求項24に記載の免疫調節組成物。

33. 前記距離が約0.1  $\mu\text{m}$ ～約20  $\mu\text{m}$ である、請求項32に記載の免疫調節組成物。

34. 前記距離が約0.15  $\mu\text{m}$ ～約10  $\mu\text{m}$ である、請求項33に記載の免疫調節組成物。

35. 前記ISSおよび抗原が、該ISSおよび該抗原が免疫標的に同時に送達されるように近位に会合している、請求項24に記載の免疫調節組成物。

36. 前記免疫標的がリンパ性構造である、請求項35に記載の免疫調節組成物。

37. 前記免疫標的が抗原提示細胞である、請求項35に記載の免疫調節組成物。
38. 前記抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項37に記載の免疫調節組成物。
39. 前記抗原提示細胞がマクロファージ細胞である、請求項37に記載の免疫調節組成物。
40. 前記抗原提示細胞がリンパ球である、請求項37に記載の免疫調節組成物。
41. アジュバントをさらに含む、請求項24に記載の免疫調節組成物。
42. 前記ISSおよび抗原が包膜化によって近位に会合している、請求項40に記載の免疫調節組成物。
43. 前記ISSおよび抗原が、プラットフォーム分子に結合することによって近位に会合している、請求項40に記載の免疫調節組成物。
44. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項1に記載の免疫調節オリゴヌクレオチドを、該免疫応答を調節するのに十分な量で該個体に投与する工程を包含する、方法。
45. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項44に記載の方法。
46. 個体における免疫応答を調節する方法であって、配列番号2の免疫調節オリゴヌクレオチドを、該免疫応答を調節するのに十分な量で該個体に投与する工程を包含する、方法。
47. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項46に記載の方法。
48. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項16に記載の免疫調節組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で該個体に投与する工程を包含する、方法。
49. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項48に記載の方法。

50. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項18に記載の免疫調節組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

51. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項50に記載の方法。

52. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項21に記載の免疫調節組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

53. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項52に記載の方法。

54. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項24に記載の免疫調節組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

55. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項54に記載の方法。

56. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項28に記載の免疫調節組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

57. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項56に記載の方法。

58. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項41に記載の免疫調節組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

59. 前記免疫応答を調節する工程がTh1応答の誘導を含む、請求項58に記載の方法。

60. 前記個体が、ガン、アレルギー性疾患、喘息、および感染性疾患からなる群より選択される障害を患っている、請求項44に記載の方法。

61. 前記感染性疾患が、B型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、およびヒト

免疫不全ウイルスからなる群より選択されるウイルスにより引き起こされる、請求項60に記載の方法。

62. 個体における感染性疾患を予防する方法であって、請求項16に記載の免疫調節組成物を投与する工程を包含する、方法。

63. 前記感染性疾患がウイルス感染に起因する、請求項62に記載の方法。

64. 前記ウイルスが、B型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペス

ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびパピローマウイルスからなる群より選択される、請求項63に記載の方法。

65. 前記感染性疾患が細菌感染に起因する、請求項62に記載の方法。

66. 前記細菌が、*Hemophilus influenza*、*Mycobacterium tuberculosis*、および*Bordetella pertussis*からなる群より選択される、請求項65に記載の方法。

67. 前記感染性疾患が寄生性感染に起因する、請求項62に記載の方法。

68. 寄生性因子が、マラリア性プラスモディウム属、*Leishmania*種、*Trypanosoma*種、および*Schistosoma*種からなる群より選択される、請求項67に記載の方法。

69. 個体における感染性疾患を予防する方法であって、請求項2に記載の免疫調節組成物を投与する工程を包含する、方法。

70. 個体における感染性疾患を予防する方法であって、請求項18に記載の免疫調節組成物を投与する工程を包含する、方法。

71. 個体における感染性疾患を予防する方法であって、請求項21に記載の免疫調節組成物を投与する工程を包含する、方法。

72. 個体における感染性疾患を予防する方法であって、請求項24に記載の免疫調節組成物を投与する工程を包含する、方法。

73. 免疫応答を調節する方法であって、請求項28に記載の免疫調節組成物を投与する工程を包含する、方法。

74. オリゴヌクレオチドのヒト免疫刺激活性についてスクリーニングする方法であって、以下の工程：

(a) マクロファージ細胞および試験されるオリゴヌクレオチドのアリコートを提供する工程；

(b) 工程 (a) の細胞およびオリゴヌクレオチドを適切な時間インキュベートする工程；

(c) 細胞培養上清中のTh1に偏ったサイトカインの相対量を決定する工程、を包含する、方法。

75. 前記細胞が、90196B細胞株およびP388D1細胞株から選択される、請求項74に記載のオリゴヌクレオチドのヒト免疫刺激活性についてスクリーニングする方法。

76. 前記決定されたTh1に偏ったサイトカインの少なくとも1つがインターフェロン- $\gamma$ である、請求項74に記載のオリゴヌクレオチドのヒト免疫刺激活性についてスクリーニングする方法。

77. 前記決定されたTh1に偏ったサイトカインの少なくとも1つがインターロイキン-12である、請求項74に記載のオリゴヌクレオチドのヒト免疫刺激活性についてスクリーニングする方法。

78. ポリヌクレオチドを含む免疫調節組成物であって、(a) 免疫調節配列 (ISS)；(b) 抗原；および(c) ミョウバンとは異なるアジュバントを含み、該ISSが5'-シトシン、グアニン-3'を含み、該ISSと抗原とが結合体化しておらず、そして該アジュバントは、アジュバントを含まない該ISSおよび抗原の同時投与と比較して、免疫応答を増強するのに十分な量である、免疫調節組成物。

79. 前記ISSがパリンδροーム領域を含み、そして該パリンδροーム領域は5'-シトシン、グアニン-3'配列を含む、請求項78に記載の免疫調節組成物。

80. 個体における免疫応答を調節する方法であって、請求項78に記載の組成物を、該免疫応答を調節するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。



**【発明の詳細な説明】****免疫刺激オリゴヌクレオチド、その組成物およびその使用方法****関連出願の引用**

本出願は、係属中の米国仮特許出願第60/048,793号（1997年6月6日出願）の優先権を主張する。上述の仮出願は、これによって本明細書中で参考としてその全体が援用される。

**技術分野**

本発明は、免疫刺激オリゴヌクレオチド配列（ISS）を含む免疫調節組成物に関する。本発明はさらに、少なくとも1塩基が、シトシン上のC-5またはC-6への電子吸引性部分の付加により修飾される塩基に置換されているISSを含む免疫調節組成物に関する。これはまた、少なくとも1つの免疫応答を調節するオリゴヌクレオチド配列の投与にも関する。本発明はさらに、潜在的な免疫調節活性を有するオリゴヌクレオチドを同定するためのインビトロスクリーニング方法にも関する。

**背景技術**

感染または他の抗原性チャレンジに対して生じる免疫応答のタイプは、一般には応答において含まれるTヘルパー（Th）細胞のサブセットにより区別され得る。Th1のサブセットは、古典的な細胞媒介性機能（例えば、遅延型過敏症および細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の活性化）を担うのに対し、Th2のサブセットは、B-細胞活性化のためのヘルパーとしてより効果的に機能する。抗原に対する免疫応答のタイプは、一般には抗原に応答する細胞により生成されるサイトカインにより決定される。Th1細胞およびTh2細胞により分泌されるサイトカインにおける相違は、これら2つのサブセットの異なる生物学的機能を反映すると考えられている。

Th1サブセットは、IL-2およびIFN- $\gamma$ （これらはCTLを活性化させる）を分泌することから、ウイルス感染および細胞内病原体に応答するために特に適切であり得る。IL-4およびIL-5は、IgE産生および好酸球活性化をそれぞれ誘導することが公知であることから、Th2のサブセットは、独立して生存可能な（free-living

）細菌および寄生虫に対する応答にさらに適切であり得、そしてアレルギー性反応を媒介し得る。一般には、Th1細胞およびTh2細胞は、異なるパターンのサイトカインを分泌し、従ってあるタイプの応答は他のタイプの応答の活性を緩和し得る。Th1/Th2のバランスの変化は、例えば、アレルギー応答を、あるいは、CTL応答の増加を生じ得る。

特定の抗原に対する宿主動物の免疫は、免疫原性形態の抗原を用いて宿主を反復してワクチン接種することにより伝統的に達成されてきた。大半の現行ワクチンは、効果的な体液性(抗体、すなわち「Th2型」)応答を誘発する一方で、これらは、一般には無いかまたは弱い細胞性応答(特に、主要組織適合複合体(MHC)クラスI拘束CTL、すなわち「Th1型」応答)を誘発することが出来ない。多くの感染性疾患(例えば、結核およびマラリア)にとって、Th2型応答は、感染に対して予防的価値がほとんどない。さらに、抗体応答は、特定の適応症において不適切であり、最も著しくは抗体応答がアナフィラキシーショックを生じ得るアレルギーにおいて不適切である。標的抗原由来の低分子ペプチドを使用する提唱されるワクチンおよび他の現行で使用される潜在的に感染性であるインタクトなウイルス粒子の使用を避ける抗原性因子は、治療的效果を達成するために必要な免疫応答を常に誘発するわけではない。治療上で効果的なヒト免疫不全ウイルス(HIV)ワクチンがないことは、この失敗の不幸な例である。

タンパク質ベースのワクチンは、代表的にはTh2型免疫応答を誘導し、高力価の中和抗体により特徴付けられるが有意な細胞媒介性免疫がないことにより特徴付けられる。対照的に、「裸」か、または複合体化されていない、抗原をコードするDNAの皮内送達、抗原に対する免疫応答をTh1型に偏って刺激し、これはIFN- $\gamma$ 産生CD4<sup>+</sup>T細胞および細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞の拡大により特徴付けられる。Manickanら、(1995) J. Immunol. 155:250-265; Xiangら、(1995) Immunity 2:129-135; Razら、(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5141-5145; および Briodeら、(1997) J. Allergy Clin. Immunol. 99:s129。抗原をコードする裸のDNAの注射

は、コードされた抗原に対する体液性および細胞性の免疫応答の両方を再現可能に誘導する。Pardoll および Beckerleg (1995) Immunity 3:165-169。DNAワクチ

ンは、感染性疾患の予防法の新しいアプローチを提供し得る。例えば、Dixon (1995) *Bio/Technology* 13:420およびそこで引用される参考文献を参考のこと。

翻訳されない特定のタイプのDNAは、免疫応答を刺激することが示されてきた。細菌性DNAは、注射されたマウスにおいて抗DNA抗体を、ならびにマクロファージおよびナチュラルキラー (NK) 細胞によるサイトカイン産生を誘導する。Pisetsky (1996) *J. Immunol.* 156:421-423 ; Shimadaら (1986) *Jpn. J. Cancer Res.* 77:808-816 ; Yamamotoら、(1992a) *Microbiol. Immunol.* 36:983-997; および Cowderyら、(1996) *J. Immunol.* 156:4570-4575。

細菌性DNAのB細胞およびNK細胞活性化特性は、中心の非メチル化CpGジヌクレオチドを含む短い配列 (6塩基対の六量体) と結び付けられている。Yamamotoら、(1992a) ; および Kriegら、(1995) *Nature* 374:546-549。2つの5' プリンおよび2つの3' ピリミジンに隣接するCpG配列を含むオリゴヌクレオチドは、B細胞およびNK細胞の刺激において最も強力であることを示されてきた。例えば、六量体を含む様々なオリゴヌクレオチドが、マウス脾臓細胞のNK細胞活性を増強するそれらの能力について試験された場合、最も免疫原性な六量体として、AACGTT、AGCGCT、GACGTCが挙げられた。Yamamotoら、(1992b) *J. Immunol.* 148:4072-4076。オリゴヌクレオチドに応じたB細胞活性化を測定した研究では、最も刺激性のある6量体配列 (例えば、AACGTC、AACGTT、GACGTC、GACGTT) はまた、5' -プリン、プリン、CG、ピリミジン、ピリミジン-3' の配列と一致した。Kriegら、(1995)。しかし、本明細書で示されるように、この原型となる六量体配列は、免疫刺激性ではない多くのオリゴヌクレオチドで見出される。従って、Kriegら (1995) により提唱される原型となる六量体配列は、免疫刺激性活性であるとは予測されない。

細菌性DNAが、マクロファージを刺激してIL-12およびTNF- $\alpha$ を産生した。これらのマクロファージ産生サイトカインは、脾細胞からIL-12およびIFN- $\gamma$ の産生を誘導することが見出された。Halpemら、(1996) *Cell. Immunol.* 167:72-78。細菌性DNAまたはCpG含有オリゴヌクレオチドのいずれかによる脾細胞のインビ  
ト

ロ処理は、IL-6、IL-12およびIFN- $\gamma$ の産生を誘導した。Klirmanら、(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879-2883。これら全てのサイトカインの産生は、Th2型応答ではなくTh1型の免疫応答の誘導を示す。

今日までに、免疫刺激に必要かつ十分の両者である配列については、明確な合意に到達していない。CpG含有オリゴヌクレオチドに応じたNK活性の誘導を試験した最近の研究によって、非メチル化CpGモチーフは、NK溶解活性のオリゴヌクレオチド誘導のために必要だが十分ではないことが示唆された。Ballasら、(1996) *J. Immunol.* 157:1840-1845。CpGに隣接する配列は、オリゴヌクレオチドの免疫刺激活性に影響するようであった。免疫刺激配列の免疫刺激活性は、アデノシンのメチル化、およびヌクレオチドが1本鎖であるかまたは2本鎖であるかとは独立しているようである。例えば、Tokunagaら (1989) *Microbiol. Immunol.* 33:929; Tokunagaら、(1992) *Microbiol. Immunol.* 36:55-65; Yamamotoら、(1992b) ; Messinaら、(1993) *Cell. Immunol.* 147:148-157; および Satoら、(1996) *Science* 273:352-354を参照のこと。オリゴヌクレオチド長もまた、因子ではないようである。なぜなら、4kb長の2本鎖DNA (Satoら、(1996)) または15ヌクレオチド長ほどの短い1本鎖DNA (Ballasら、(1996)) が免疫応答を誘起 (illicit) したので。 ; オリゴヌクレオチド長が8塩基より短くされるか、またはDNAがCpGメチラーゼでメチル化される場合であっても、免疫刺激活性は無くなった。Kriegら、(1995)。

アレルギー性応答 (アレルギー性喘息のアレルギー性応答を含む) は、早期段階応答 (これはアレルゲン暴露の数秒以内から数分以内に生じ、そして細胞の顆粒消失により特徴付けられる) および後期段階応答 (これは4~24時間後に起こり、そしてアレルゲン暴露部位への好酸球の浸潤により特徴付けられる) により特徴付けられる。具体的には、アレルギー性応答の早期段階の間ではTh2型のリンパ球の活性化は、抗原特異的IgE抗体の産生を刺激し、これは次に、マスト細胞および好塩基球からのヒスタミンおよび他の炎症メディエーターの放出を引き起こす。後期段階応答の間には、CD4<sup>+</sup> Th2細胞によるIL-4およびIL-5産生が上昇する。これらのサイトカインは、アレルゲン暴露部位 (ここでは組織損傷および機能不全が生じる) への好酸球の補充に有意な役割を果たすようである。

アレルギー性障害についての抗原免疫療法は、少量の、しかし漸増量の抗原の皮下注射を含む。このような免疫処置は、IgE媒介性アナフィラキシーを誘導する危険を示し、そしてアレルギー性後期段階応答のサイトカイン媒介性事象には取り組まない。

特定のDNA含有免疫刺激モチーフでのワクチン接種は、Th1型に偏った免疫応答を誘導する。例えば、生理食塩水またはアジュバントであるミョウバンの中の*Escherichia coli* (*E. coli*)の $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) を皮内注射されたマウスは、特異的IgG1およびIgE抗体、ならびにIL-4およびIL-5を分泌するがIFN- $\gamma$ を分泌しないCD4<sup>+</sup>細胞を産生することにより応答し、T細胞が主にTh2サブセットのT細胞であることを実証した。しかし、 $\beta$ -Galをコードし、かつISSを含むプラスミドDNA (生理食塩水中) を皮内に (または尖又皮膚の引っ掻き傷用アプリケーションで) 注射されたマウスは、IgG2a抗体、ならびにIFN- $\gamma$ を分泌するがIL-4およびIL-5を分泌しないCD4<sup>+</sup>細胞を産生することにより応答し、T細胞が主にTh1のサブセットのT細胞であることを実証した。さらに、プラスミドDNAを注射されたマウスによる特異的IgE産生は、66~75%減少した。Razら、(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5141-5145。一般には、裸のDNAの免疫に対する応答は、抗原刺激されたCD4<sup>+</sup>T細胞 (これはTh1型の応答を示す) によるIL-2、TNF $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ の産生により特徴付けられる。これはIgE産生の減少により示されるようなアレルギーおよび喘息の処置において特に重要である。

別の例では、皮内注射された、抗原をコードするプラスミドベクターにおける免疫刺激配列 (例えば、パリンδροームな六量体であるAACGTT) の存在は、多量のIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ およびIL-12の産生を刺激した。Satoら、(1996)。IFN- $\alpha$ は、Th1型の表現型に向かうナイーブT細胞の分化において役割を果たし、Th2細胞を拮抗し、IgE合成を阻害し、IgG2a産生を促進し、そしてTh1表現型の抗原特異的T細胞のクローンを誘導する。IL-12はT細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を促進し、そしてTh1細胞の成熟に好都合である。

特定の抗原に対するTh2型応答をダウンレギュレートしながら同じ抗原に対するTh1型応答を特異的に増強し得ることが、広範な種々な適応症の処置において有用である。これらの適応症の処置または軽減は、腫瘍治療、アレルギー性障害

の処置および活発な細胞性免疫応答の誘導を含むがこれらに限定されない。本発明は、これらの状況において使用され得るオリゴヌクレオチド配列を含む組成物を提供する。

前節において含まれる全ての引用文献および以下の開示に含まれる引用文献は、これによって本明細書において参考として援用される。

#### 発明の開示

本発明は、少なくとも1つの免疫刺激（ISS）オクタヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物を提供する。

好ましい実施態様では、ISSオクタヌクレオチドは、配列5'-プリン、プリン、シトシン、グアニン、ピリミジン、ピリミジン、シトシン、シトシン-3'を含む。

別の好ましい実施態様では、ISSオクタヌクレオチドは、配列5'-プリン、プリン、シトシン、グアニン、ピリミジン、ピリミジン、シトシン、グアニン-3'を含む。

さらなる実施態様では、ISSオクタヌクレオチドは、AACGTTCC、AACGTTCCG、GACGTTCC、およびGACGTTCCGから選択される。

別の実施態様では、ISSオクタヌクレオチド配列の少なくとも1つのシトシンは、修飾されたシトシンで置換され、ここで修飾されたシトシンは、少なくともC-5および/またはC-6への電子吸引性基の付加を含む。好ましくは、修飾されたシトシンは、5'-ブロモシチジンである。好ましくは、ISSオクタヌクレオチドの5'末端の3位のCは、5'-ブロモシチジンで置換されている。

別の実施態様では、免疫調節組成物は、少なくとも1つの免疫刺激オクタヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、および抗原を含む。

さらなる実施態様では、抗原は、ペプチド、糖タンパク質、多糖類、および脂質からなる群より選択される。

別の実施態様では、抗原は、ISSオリゴヌクレオチドに結合体化されている。

別の実施態様では、免疫調節組成物は、少なくとも1つの免疫刺激（ISS）オクタヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、ならびに補助的刺激分子、サイトカイン、ケモカイン、標的化タンパク質リガンド、トランス活性化因子、ペプチ

ド、および修飾されたアミノ酸を含むペプチドからなる群より選択される促進因子を含む。

別の実施態様では、免疫調節組成物は、少なくとも1つのISSオクタヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、抗原、およびアジュバントを含む。

別の実施態様では、免疫調節組成物は、免疫調節オリゴヌクレオチド、および免疫応答を増強するに効果的な距離で近位に会合している抗原を含む。

別の実施態様では、免疫調節組成物は、免疫調節オリゴヌクレオチド、および免疫標的にオリゴヌクレオチドおよび抗原を共送達するために近位に会合している抗原を含む。

別の実施態様では、免疫調節組成物は、免疫調節オリゴヌクレオチド、およびアジュバントに会合している抗原を含む。さらに、免疫調節オリゴヌクレオチドと抗原とは、微粒子中で会合している。別の実施態様では、免疫調節オリゴヌクレオチドおよび抗原は、リポソーム中で会合している。

本発明はまた、抗原および少なくとも1つのISSオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物を投与する工程を包含する、免疫応答を調節する方法を提供する。

さらなる実施態様では、免疫応答調節は、Th1応答の誘導を含む。

本発明はまた、免疫調節性促進因子および少なくとも1つのISSを含むオリゴヌクレオチドを含む免疫調節組成物を投与する工程を包含する、免疫応答を調節する方法を提供する。

本発明はまた、オリゴヌクレオチドのヒト免疫刺激活性についてスクリーニングする方法であって、以下の工程：（a）マクロファージ細胞および試験されるオリゴヌクレオチドのアリコートを提供する工程；（b）工程（a）の細胞およびオリゴヌクレオチドを適切な時間インキュベートする工程；および（c）細胞培養上清中のTh1に偏ったサイトカインの相対量を決定する工程を包含する、方法を提供する。

本発明はまた、ガン、アレルギー性疾患、および感染性疾患を患っている個体を含むがこれらに限定されない、免疫調節が必要な個体を処置する方法であって、少なくとも1つのISSを含む免疫調節オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与

す

る工程を包含する方法を提供する。さらなる実施態様は、B型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、およびヒト免疫不全ウイルスに感染した個体を処置する方法を提供する。

別の実施態様では、本発明は、ISSおよび抗原を含む免疫調節組成物を投与する工程を包含する、個体における感染性疾患を予防する方法を提供する。

さらなる実施態様は、B型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、およびパピローマウイルスによる感染に起因する疾患を含むがこれらに限定されないウイルス感染に起因する感染性疾患を予防する方法を含む。

さらなる実施態様は、*Hemophilus influenza*、*Mycobacterium tuberculosis*、および*Bordetella pertussis*による感染に起因する感染性疾患を含むがこれらに限定されない細菌感染に起因する感染性疾患を予防する方法を含む。

さらなる実施態様は、マラリア性プラスモディウム属、*Leishmania*種、*Trypanosoma*種、および*Schistosoma*種による感染に起因する感染性疾患を含むがこれらに限定されない寄生性感染に起因する感染性疾患を予防する方法を含む。

#### 図面の簡単な説明

図1は、オリゴヌクレオチドに48時間暴露した後の脾細胞の培養上清中で見出されたIFN- $\gamma$ のレベルを示したグラフである。オリゴヌクレオチドの同定については表1を参照のこと。

図2は、オリゴヌクレオチドに48時間暴露した後の脾細胞の培養上清中で見出されたIL-12のレベルを示したグラフである。オリゴヌクレオチドの同定については表1を参照のこと。

図3は、オリゴヌクレオチドに48時間暴露した後の脾細胞の培養上清中で見出されたIL-6のレベルを示したグラフである。オリゴヌクレオチドの同定については表1を参照のこと。

図4は、オリゴヌクレオチドに48時間暴露した後の脾細胞の培養上清中で見出されたIL-6のレベルを示したグラフを示す。オリゴヌクレオチドの同定について



は表2を参照のこと。

図5は、オリゴヌクレオチドに48時間暴露した後の脾細胞の培養上清中に見出されたIL-12のレベルを示したグラフを示す。オリゴヌクレオチドの同定については表2を参照のこと。

図6は、脾細胞の増殖を刺激するための修飾されたシトシンを含む様々なオリゴヌクレオチドの効力を示したグラフを示す。細胞増殖は48時間後に培養物中で決定した。オリゴヌクレオチドの同定については表2を参照のこと。

図7は、処置動物において産生された抗Amb a1 IgEの血清レベルを示したグラフである。

図8は、処置動物において産生された抗Amb a1 IgG1の血清レベルを示したグラフである。

図9は、処置動物において産生された抗Amb a1 IgG2aの血清レベルを示したグラフである。

図10は、処置動物の脾細胞からのCTL応答を示したグラフである。

図11は、処置動物の脾細胞からのCTL応答を示したグラフである。

図12は、処置動物の脾細胞から産生されたIFN- $\gamma$ を示したグラフである。

図13は、処置動物の脾細胞から産生されたIL-10を示したグラフである。

図14は、一次免疫4週間後の抗HBsAg抗体の血清レベルを示したグラフである。

図15は、二次免疫1週間後の抗HBsAg抗体の血清レベルを示したグラフである。

図16は、二次免疫4週間後の抗HBsAg抗体の血清レベルを示したグラフである。

#### 発明を実施するための態様

オリゴヌクレオチド配列内の特定のセットのオクタヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチドが免疫応答を調節し得るようにすることがここで見出された。このようなオリゴヌクレオチド配列は、免疫刺激オクタヌクレオチド配列 (ISS) を含む。本発明の組成物は、ISSオクタヌクレオチド含有オリゴヌクレオチドを単独で、または免疫調節剤 (例えば、ペプチド、抗原、および/またはさらなるアジュバント) と組合せて含む。オリゴヌクレオチド自体は、アジュバント活性を有することが見出されており、そして単独でのアジュバントとしての使用に適

切であり、そしてまた別のアジュバントの効果を増強することが見出されている。

以前に記載された免疫刺激配列は、中心のCpGジヌクレオチドを有するヘキサマー配列を含有すると定義されている。残念ながら、免疫刺激活性が予測されるヘキサマー配列に頼ると、大部分では、免疫学的に不活性なオリゴヌクレオチドを生ずる。例えば、実施例1に示されるように、ヘキサマーAACGTTを有する5つの異なるオリゴヌクレオチドは、明白な免疫刺激活性を明らかに有し、一方、AACGTTを有する5つの他のオリゴヌクレオチドは、はるかに減少した免疫刺激活性を有した。従って、以前のヘキサマーアルゴリズムは、免疫刺激活性を予測できない。

本発明のISSは、以前に記載されたヘキサマーおよびヘキサマーの3'側の2つのさらなるヌクレオチドを含むオクタヌクレオチド配列を含む。好ましくは、ISSオクタマーは、5'-プリン、プリン、シトシン、グアニン、ピリミジン、ピリミジン、シトシン、グアニン-3'を含むか、またはISSオクタマーは5'-プリン、プリン、シトシン、グアニン、ピリミジン、ピリミジン、シトシン、シトシン-3'を含む。より好ましくは、ISSオクタヌクレオチドは、5'-GACGTTCCG-3'または5'-GACGTTCC-3'を含む。なおより好ましくは、ISSオクタヌクレオチドは、5'-AACGTTCCG-3'または5'-AACGTTCC-3'を含む。本発明は、ヘキサマーISS配列と比較して、ISSオクタヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドにおける免疫刺激活性についての信頼性の高い予測物であることを実証する。

別の実施態様では、本発明のISSオリゴヌクレオチドはまた、CGジヌクレオチドを含み得、ここでC残基は、C-5および/またはC-6への電子吸引性部分の付加により修飾される（「修飾されたISS」）。同じシトシンがメチル化される場合、オリゴヌクレオチドの全ての免疫刺激活性は失われる。好ましくは、このような組成において、5'末端から3位のシトシンは、シトシンアナログ、好ましくは5-プロモシチジン、フッ化シトシン、または塩化シトシンで置換され得る。修飾されたISSのいくつかは、修飾された塩基を有さない同じ配列と比較して、より大きくはないにしても、ほぼ同じ免疫刺激活性を有する。

本発明のISSオリゴヌクレオチドは、任意の他の生理学的に受容可能な修飾されたヌクレオチド塩基を含み得る。

本発明はまた、投与されたISSのアジュバント様効果を介する免疫応答の一般的な刺激のための方法および組成物を提供する。

本発明はまた、ISS-抗原結合体を含む、免疫応答の増強のための組成物を提供する。ISS-抗原結合体は、ISSと抗原との間の共有的および／または非共有的相互作用を介して形成され得る。

本発明はまた、ISS-抗原混合物を含む組成物を提供し、この混合物中でISSおよび抗原は、溶液中のISSおよび抗原の共投与と比較して免疫応答を増強するために効果的な距離で近位に会合している。本発明はさらに、ISS-抗原複合体が標的に利用可能であるまではISSおよび抗原を近位な会合に維持し得る包膜剤を含む組成物を提供する。ISS-抗原混合物中では、ISSおよび抗原は、ISSおよび抗原の両方が同じ標的細胞により取り込まれ得るように、近位の会合に維持される。さらに、混合物中のISSおよび抗原は、免疫応答を調節するのに効果的な濃度で維持される。好ましくは、ISSおよび抗原は、約0.04  $\mu\text{m}$ ～約100  $\mu\text{m}$ の距離で、より好ましくは約0.1  $\mu\text{m}$ ～約20  $\mu\text{m}$ の距離で、さらにより好ましくは約0.15  $\mu\text{m}$ ～約10  $\mu\text{m}$ の距離で近位に会合される。ISS-抗原結合体またはISS-抗原混合物の標的は、抗原提示細胞（APC）（例えば、マクロファージ）、樹状細胞、ならびに／またはリンパ球、リンパ様構造（例えば、リンパ節および／もしくは脾臓）ならびに非リンパ様構造（特に、皮膚、肺、および／もしくは胃腸管のような樹状細胞が見出されるもの）を含むがこれらに限定されない。

ISSおよび免疫調節剤が近位に会合している組成物による免疫応答の増強とは、互いに関して自由に可溶性であるISSおよび免疫調節剤の投与後の免疫応答と比較したこの組成物の投与後の免疫応答の調節をいう。免疫応答の増強は、刺激、抑制、および免疫応答の型（例えば、Th1型応答とTh2型応答との間）のシフトを含むがこれらに限定されない免疫応答の調節を含む。

本発明はまた、ISS-抗原結合体またはISS-抗原混合物およびアジュバントを含む組成物を提供し、ここで共投与により、ISS-抗原およびアジュバントの会合は

、アジュバントを有さないISS-抗原の共投与と比較して免疫応答を増強するのに効果的である。このような組成物では、アジュバントは、標的細胞をISS-抗原に補充および活性化するように、ISS-抗原と会合して維持される。

本発明はまた、免疫応答の刺激における抗原と組合せたISSの使用方法を提供する。好ましくは、このような方法において使用する場合には、ISSは、抗原に対するTh1型免疫応答の生成においてアジュバント様の活性を提供する。

好ましくは、本発明に従って刺激された免疫応答は、Th1型表現型に偏り、そしてTh2型表現型から離れる。本発明を参照すると、Th1型免疫応答を刺激することは、ISSを伴わずに処理した細胞からのサイトカイン産生と比較して、ISSで処理した細胞からのサイトカイン産生を測定することにより、インビトロまたはエキソビボで決定され得る。細胞のサイトカイン生成を決定する方法は、本明細書中に記載される方法、および当該分野で公知の任意のものを含む。ISS処理に応答して産生されるサイトカインの型は、細胞による、Th1型またはTh2型に偏った免疫応答を示す。本明細書中で使用される用語「Th1型に偏った」サイトカイン産生とは、刺激の非存在下でのこのようなサイトカインの産生と比較した場合の、刺激因子の存在下でのTh1型免疫応答に関連したサイトカインの測定可能な増加した産生をいう。このようなTh1型に偏ったサイトカインの例は、IL-2、IL-12、およびIFN- $\gamma$ を含むがこれらに限定されない。対照的に、「Th2型に偏ったサイトカイン」とは、Th2型免疫応答に関連したサイトカインをいい、そしてIL-4、IL-5、IL-10、およびIL-13を含むがこれらに限定されない。ISS活性の決定のために有用な細胞は、免疫系の細胞、宿主から単離された初代細胞および／または細胞株、好ましくはAPCおよびリンパ球、さらにより好ましくはマクロファージおよびT細胞を含む。

Th1型免疫応答を刺激することはまた、ISS-抗原組成物で処置した宿主において測定され得、そして以下を含むがこれらに限定されない当該分野で公知の任意の方法により決定され得る：(1)抗原チャレンジの前および後で測定したIL-4のレベルの低下；または抗原でプライミングした、またはプライミングおよびチャレンジした、ISSなしで処置したコントロールと比較して、ISS-抗原処置宿主に

においてさらに低い（または存在さえしない）レベルのIL-4の検出；(2)抗原チャレンジの前および後のIL-12、IL-18、および／またはIFN（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、もしくは $\gamma$ ）のレベルの上昇；または抗原でプライミングした、またはプライミングおよびチャレンジした、ISSなしで処置したコントロールと比較して、ISS-抗原処置宿主におけるさらに高いレベルのIL-12、IL-18、および／またはIFN（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、

もしくは $\gamma$ ）の検出；(3)ISSなしで処置したコントロールと比較して、ISS-抗原処置宿主におけるIgG2a抗体産生；ならびに／あるいは(4)抗原チャレンジの前および後で測定した場合の抗原特異的IgEのレベルの低下；または抗原でプライミングした、またはプライミングおよびチャレンジした、ISSなしで処置したコントロールと比較して、ISS-抗原処置宿主においてより低い（または存在さえしない）レベルの抗原特異的IgEの検出。これらの種々の決定は、APCおよび／またはリンパ球、好ましくはマクロファージおよび／またはT細胞により作製されるサイトカインを、インビトロまたはエキソビボで、本明細書中に記載される方法または当該分野で公知の任意の方法を用いて測定することにより行なわれ得る。抗体産生を決定する方法は、当該分野で公知の任意の方法を含む。

ISS投与の結果として生じる、Th1型に偏ったサイトカイン誘導は、細胞免疫応答の増強（例えば、NK細胞、細胞傷害性キラー細胞、Th1ヘルパーおよび記憶細胞により行なわれるもの）を生じる。これらの応答は、ウイルス、真菌、原生動物、寄生体、細菌、アレルギー性疾患、および喘息、ならびに腫瘍に対する防御的または治療的ワクチン接種における使用に特に有益である。

一般的技術

本発明の実施は、他に示さない限り、当該分野の技術範囲内である分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術を用いる。このような技術は、例えば以下の文献において十分に説明される：

「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版（Sambrookら、1989）；「Oligonucleotide Synthesis」（M. J. Gait編、1984）；「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney編、1987）；「Methods in Enzymology」（Academic Press, Inc.）；「Handbook of Experimental Immunology」（D. M. WeirおよびC. C. Black

well編) ; 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」 (J.M. MillerおよびM. P. Calos編, 1987) ; 「Current Protocols in Molecular Biology」 (F.M. Ausubelら編, 1987) ; 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullisら編, 1994) ; ならびに「Current Protocols in Immunology」 (J.E. Colliganら編, 1991) 。

### ISSを含有する組成物

本発明の組成物は、所望の免疫応答を誘発し得るISSである。本明細書中で使用される用語「ISS」は、インビトロ、インビボ、および／またはエキスビボで測定される測定可能な免疫応答をもたらすオリゴヌクレオチド配列をいう。測定可能な免疫応答の例は、抗原特異的抗体産生、サイトカインの分泌、リンパ球集団（例えば、NK細胞、CD4<sup>+</sup> Tリンパ球、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球、Bリンパ球など）の活性化または拡大を含むがこれらに限定されない。好ましくは、ISS配列は、Th1型応答を優先的に活性化する。組成物のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのオクタマーISSを含む。

オクタマーISSは、好ましくは、一般的オクタマー配列5'-プリン、プリン、シトシン、グアニン、ピリミジン、ピリミジン、シトシン（シトシンまたはグアニン）-3'である、CG含有配列を含む。最も好ましくは、ISSは、AACGTTCC、AACGTTCCG、GACGTTCC、およびGACGTTCCGからなる群より選択されるオクタマーを含む。

免疫刺激オリゴヌクレオチドがRNA配列を含む場合、ISSは好ましくは、AACGUUCC、AACGTTCCG、GACGUUCC、およびGACGUUCCGからなる群より選択される一本鎖または二本鎖の配列を含む。

本発明によれば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのISSを含み、そして複数のISSを含み得る。ISSは、オリゴヌクレオチド内で隣接し得るか、またはオリゴヌクレオチド内でさらなるヌクレオチド塩基により隔てられ得る。

本明細書中で交換可能に用いられる用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、一本鎖DNA (ssDNA)、二本鎖DNA (dsDNA)、一本鎖RNA (ssRNA)、および二本鎖RNA (dsRNA)、修飾されたオリゴヌクレオチド、およびオリゴヌクレオシド、またはこれらの組合せを含む。オリゴヌクレオチドは、直鎖状

または環状の構造であり得るか、またはオリゴヌクレオチドは、直鎖状および環状のセグメントの両方を含み得る。

ISSは、長さが6塩基または塩基対よりも長い、好ましくは15塩基または塩基対よりも長く、より好ましくは20塩基または塩基対よりも長い任意の長さのものであり得る。

一般に、dsRNAは、免疫刺激効果を発揮し、そして本発明により包含される。I

SSの修飾は、当該分野で公知の任意のもの（3' OHまたは5' OH基の修飾、ヌクレオチド塩基の修飾、糖成分の修飾、およびリン酸基の修飾）を含むがこれらに限定されない。種々のこのような修飾は以下に記載される。

#### 修飾された塩基および塩基アナログ

オリゴヌクレオチドは、一般に、ホスホジエステル結合により連結されたヌクレオシドのポリマーである。ヌクレオシドは、糖に結合したプリン（アデニンもしくはグアニンまたはそれらの誘導体）あるいはピリミジン（チミン、シトシン、もしくはウラシル、またはそれらの誘導体）塩基からなる。DNAにおける4つのヌクレオシド単位（または塩基）は、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、およびデオキシシチジンと呼ばれる。ヌクレオチドは、ヌクレオシドのリン酸エステルである。

任意の組合せの複数の塩基、糖、またはリン酸は、ISS中で置換され得る。

本発明のオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド（唯一のまたは主な糖成分としてリボースを含有する）、デオキシリボヌクレオチド（主な糖成分としてデオキシリボースを含有する）を含み得るか、または当該分野の状態に従って、修飾された糖または糖アナログがISS中に取り込まれ得る。従って、リボースおよびデオキシリボースに加えて、糖部分は、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、グルコース、アラビノース、キシロース、リキソース、および糖「アナログ」シクロペンチル基であり得る。糖は、ピラノシル形態またはフラノシル形態であり得る。ISSでは、糖部分は、好ましくは、リボース、デオキシリボース、アラビノース、または2'-O-メチルリボースのフラノシドであり、そして糖は、それぞれの複素環式塩基に $\alpha$ または $\beta$ アノマー配置の

いずれかで結合され得る。これらの糖または糖アナログおよびそれぞれの「ヌクレオシド」（ここでこのような糖またはアナログは、複素環式塩基（核酸塩基）自体に結合している）の調製は公知であり、そしてこのような調製が任意の特定の例に関与し得る程度以外にはここで記載する必要はない。

本発明のオリゴヌクレオチドにおいて糖または糖アナログ部分に結合し得る亜リン酸誘導体（または修飾されたリン酸基）は、モノホスフェート、ジホスフェ

ート、トリホスフェート、アルキルホスフェート、アルカンホスフェート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなどであり得る。ホスホロチオエート結合は、ホスホジエステル結合の代わりに用いられ得る。上記のリン酸アナログの調製、ならびにヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドへのそれらの取込み自体もまた公知であり、ここで詳細に記載する必要はない。Peyrottesら（1996）*Nucleic Acids Res.* 24:1841-1848; Chaturvediら（1996）*Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323; およびSchultzら（1996）*Nucleic Acids Res.* 24:2966-2973。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含む。ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル骨格を有するオリゴヌクレオチドよりも免疫原性であり得、そして宿主への注射後の分解にさらに耐性であるようである。Braunら（1988）*J. Immunol.* 14:2084-2089; およびLatimerら（1995）*Mol. Immunol.* 32:1057-1064。

ISS中に取り込まれる複素環式塩基、すなわち核酸塩基は、天然に存在する主なプリンおよびピリミジン塩基（すなわち、上記のようにウラシルまたはチミン、シトシン、アデニン、およびグアニン）、ならびにこの主な塩基の天然に存在する修飾物および合成の修飾物であり得る。

当業者は、種々の複素環式塩基および種々の糖部分（および糖アナログ）を含む多数の「合成」非天然ヌクレオシドが当該分野で利用可能であること、そして本発明の他の基準が満たされる限り、ISSは、天然に存在する核酸の主な5つの塩基成分以外の1または数個の複素環式塩基を含み得ることを認識する。しかし、好ましくは、ISS中の複素環式塩基は、ウラシル-5-イル、シトシン-5-イル、アデニン-7-イル、アデニン-8-イル、グアニン-7-イル、グアニン-8-イル、4-ア



ミノピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル、2-アミノ-4-オキソピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル、2-アミノ-4-オキソピロロ[2,3-d]ピリミジン-3-イル基（ここで、プリンは9位を介して、ピリミジンは1位を介して、ピロロピリミジンは7位を介して、そしてピラゾロピリミジンは1位を介して、ISSの糖部分に結合している）を含むがこれらに限定されない。

1つの実施態様では、ISSは、少なくとも1つの修飾された塩基を含む。本明細書中で用いられる用語「修飾された塩基」は、「塩基アナログ」と同義語であ

り、例えば「修飾されたシトシン」は、「シトシンアナログ」と同義語である。同様に、「修飾された」ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、本明細書中で、ヌクレオシドまたはヌクレオチド「アナログ」と同義語であると定義される。好ましい実施態様では、ISSのシトシンは、シトシンのC-5および/またはC-6への、電子吸引性部分の付加により修飾されたシトシンで置換される。好ましくは、電子吸引性部分は、ハロゲンである。このような修飾されたシトシンは、アザシトシン、5-ブロモシトシン、ブロモウラシル、5-クロロシトシン、塩化シトシン、シクロシトシン、シトシンアラビノシド、フッ化シトシン、フルオロピリミジン、フルオロウラシル、5,6-ジヒドロシトシン、ハロゲン化シトシン、ハロゲン化ピリミジンアナログ、ヒドロキシウレア、ヨードウラシル、5-ニトロシトシン、ウラシル、および任意の他のピリミジンアナログもしくは修飾されたピリミジンを含み得るがこれらに限定されない。

#### ISSを用いて免疫応答を調節する方法

1つの実施態様では、本発明は、ISSを免疫学的に活性な唯一の物質として含む組成物を提供する。投与に際し、このようなISSは、免疫系の刺激を誘導する。

他の実施態様では、ISSは、抗原（タンパク質、糖タンパク質、多糖類、および脂質を含むがこれらに限定されない）を含む免疫調節分子のグループの1つ以上のメンバー、ならびに/または免疫調節促進因子（例えば、補助的刺激分子（サイトカイン、ケモカイン、標的化タンパク質リガンド、トランス活性化因子、ペプチド、および修飾されたアミノ酸を含むペプチドを含むがこれらに限定され

ない) ならびにアジュバント (ミョウバン、脂質エマルジョン、およびポリラクチド/ポリグリコリド微粒子を含むがこれらに限定されない) ) と組みあわせて投与され得る。本明細書中で用いられる用語「免疫調節」は、免疫刺激効果ならびに免疫抑制効果を含む。免疫刺激効果は、細胞性または体液性の免疫応答を直接的または間接的に増強する効果を含むがこれらに限定されない。免疫刺激効果の例は、抗原特異的抗体産生の増加；リンパ球集団 (例えば、NK細胞、CD4<sup>+</sup> Tリンパ球、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球、マクロファージなど) の活性化または増殖；IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  などを含むがこれらに限定さ

れない免疫刺激サイトカイン合成の増加を含むがこれらに限定されない。免疫抑制効果は、細胞性または体液性の免疫応答を直接的または間接的に減少させることを含む。免疫抑制効果の例は、抗原特異的抗体産生の減少 (例えば、IgE産生の減少) ；リンパ球または免疫抑制活性を有する他の細胞集団 (例えば、免疫寛容をもたらすもの) の活性化；および特定の細胞機能に対して抑制効果を有するサイトカイン合成の増加を含むがこれらに限定されない。これの1つの例は、IFN- $\gamma$  である。IFN- $\gamma$  は、IgEおよびIgG1へのIL-4誘導性クラススイッチをブロックし、それによりこれらの抗体のサブクラスのレベルを低下させるようである。

ISSならびに抗原および/または免疫調節促進因子は、免疫応答を調節するように、結合体の形態で一緒に投与され得るか、または時間的に十分に近接して混合物中で共投与され得る。好ましくは、ISSおよび免疫調節分子は、同時に投与される。本明細書中で用いられる用語「共投与」は、少なくとも2つの異なる物質の投与が免疫応答を調節するのに十分に時間的に近接していることをいう。好ましくは、共投与は、少なくとも2つの異なる物質の同時投与をいう。

本明細書中で用いる用語「結合体」は、ISSおよび免疫調節分子が結合している複合体をいう。このような結合体の結合は、共有結合および/または非共有結合を含む。

本明細書中で用いる用語「抗原」は、抗体またはT細胞抗原レセプターにより特異的に認識および結合される物質を意味する。抗原は、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖類、ガングリオシド、および脂質；それらの部分、ならび

にそれらの組合せを含み得る。抗原は、天然に見出され得るものであり得るか、または合成物であり得る。ハプテンは、「抗原」の範囲内に含まれる。ハプテンは、それ自体は免疫原性ではないが、抗原決定基を含む免疫原性分子と結合体化された場合に免疫原性にされる低分子量化合物である。

本明細書中で使用されるように、用語「アジュバント」は、免疫原性物質に添加した場合に、混合物に曝露した際にレシピエント宿主中の因子に対する免疫応答を非特異的に促進または増強する物質をいう。

免疫応答の刺激において、ほとんどのアジュバントは一般に、注射の部位においてマクロファージを刺激することが見出されている。本明細書中に記載される

ように、ISSは、マクロファージ細胞からのサイトカイン産生を刺激し、そのようにして免疫刺激ポリヌクレオチドは、アジュバントとして機能することが示されている。従って、別の実施態様において、本発明は、ISSおよび抗原を含む組成物を提供する。ISSとともに投与するのに適切な抗原は、B細胞またはT細胞抗原特異的応答を誘発し得る任意の分子を含む。好ましくは、抗原は、抗原に特異的な抗体応答を誘発する。広範な種々の分子は、抗原である。これらには、糖、脂質、およびポリペプチド、ならびに複合糖質およびリン脂質のような高分子が含まれるが、これらに限定されない。低分子は、抗原性になるためにハプテン化される必要があり得る。好ましくは、本発明の抗原は、ペプチド、脂質（例えば、ステロール、脂肪酸、およびリン脂質）、*Hemophilus influenza* ワクチンにおいて使用されるような多糖、ガングリオシド、ならびに糖タンパク質を含む。

本明細書中で使用される用語「ペプチド」には、そのペプチドがハプテンであろうとなかろうと、生物学的応答（例えば、抗体産生またはサイトカイン活性）をもたらすのに十分な長さおよび組成のペプチドおよびタンパク質が含まれる。代表的には、ペプチドは、少なくとも6アミノ酸残基長である。用語「ペプチド」は、改変されたアミノ酸をさらに含み、このような改変には、リン酸化、グリコシル化、ペグ化、脂質化、およびメチル化が含まれるが、これらに限定されない。

1つの実施態様において、本発明は、ISSおよび抗原性ペプチドを含む組成物

を提供する。抗原性ペプチドには、精製された天然のペプチド、合成ペプチド、組換えタンパク質、粗タンパク質抽出物、弱毒化もしくは不活化ウイルス、細胞、微生物、またはこのようなペプチドのフラグメントが含まれる。

多くの抗原性ペプチドおよびタンパク質は、公知であり、そして当該分野で入手可能である；他は、従来技術を使用して同定され得る。免疫調節促進因子（immunomodulatory facilitator）として作用し得るタンパク質抗原には、以下の例が含まれるが、これらに限定されない。単離された天然のまたは組換えの抗原は、植物の花粉（例えば、Rafnarら（1991）*J. Biol. Chem.* 266:1229-1236; Breitenederら（1989）*EMBO J.* 8:1935-1938; Elsayedら（1991）*Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 204:17-31; および Malley（1989）*J. Reprod. Immunol.*

16:173-186を参照のこと）、ダストマイト（dust mite）タンパク質（例えば、Chuaら（1988）*J. Exp. Med.* 167:175-182; Chuaら（1990）*Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91:124-129; および Joost van Neervenら（1993）*J. Immunol.* 151:2326-2335を参照のこと）、動物のふけ（例えば、Rogersら（1993）*Mol. Immunol.* 30:559-568を参照のこと）、動物の唾液、ハチ毒、および真菌の芽胞から誘導され得る。生存している、弱毒化された、そして不活化された微生物（例えば、HIV-1、HIV-2、単純ヘルペスウイルス、A型肝炎ウイルス（Bradleyら（1984）*J. Med. Virol.* 14:373-386）、ロタウイルス、ポリオウイルス（Jiangら（1986）*J. Biol. Stand.* 14:103-109）、B型肝炎ウイルス、はしかウイルス（Jamesら（1995）*N. Engl. J. Med.* 332:1262-1266）、ヒトおよびウシパピローマウイルス、ならびに遅発性脳ウイルスは、ペプチド抗原を提供し得る。腫瘍形成に対する免疫化について、免疫調節ペプチドは、腫瘍細胞（生存または照射された）、腫瘍細胞抽出物、または腫瘍抗原のタンパク質サブユニットを含み得る。免疫ベースの避妊のためのワクチンは、ISSとともに投与された精子タンパク質を含むことによって形成され得る。Leaら（1996）*Biochim. Biophys. Acta* 1307:263。

ISSおよび抗原は、ISS抗原結合体として投与され得、そして/またはそれらは混合物の形態（例えば、エマルジョン）で複合体として同時投与され得る。ISS抗原結合体におけるISSおよび抗原分子の会合は、共有結合相互作用を介して、

および/または非共有結合相互作用（高親和性および/または低親和性相互作用を含む）を介してであり得る。ISS-抗原結合体においてISSと抗原とを結合させ得る非共有結合相互作用の例には、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、およびファンデルワールス力が含まれるが、これらに限定されない。

別の実施態様において、ISSは、1つ以上の免疫調節促進因子と組み合わせて投与され得る。従って、本発明は、ISSおよび免疫調節促進因子を含む組成物を提供する。本明細書中で使用される用語「免疫調節促進因子」は、ISSの免疫調節活性を支持および/または増強する分子をいう。免疫調節促進因子の例には、補助的刺激分子（例えば、サイトカイン）および/またはアジュバントが含まれ得る。ISSおよび促進因子は、ISS促進因子結合体として投与され得、そして/またはそれらは混合物の形態（例えば、エマルジョン）において複合体として同時投

与され得る。ISS促進因子結合体におけるISSおよび促進因子分子の会合は、共有結合的相互作用および/または非共有結合的相互作用（高親和性および/または低親和性相互作用を含む）を介してであり得る。ISS-促進因子結合体においてISSと促進因子とを結合させ得る非共有結合相互作用の例には、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、およびファンデルワールス力が含まれるが、これらに限定されない。

免疫調節促進因子には、補助的刺激分子（サイトカイン、ケモカイン、標的化タンパク質リガンド、トランス活性化因子、ペプチド、および改変されたアミノ酸を含むペプチド）およびアジュバント（例えば、ミョウバン、脂質エマルジョン、およびポリラクチド/ポリグリコリド微小粒子）が含まれるが、これらに限定されない。

ISSとともに投与するための適切な免疫調節サイトカインペプチドは、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3など）、インターフェロン（例えば、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ ）、エリスロポエチン、コロニー刺激因子（例えば、G-CSF、M-CSF、GM-CSF）、およびTNF- $\alpha$ である。好ましくは、ISSオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用するための免疫刺激ペプチドは、Th1-型免疫応答を刺激するもの（例えば、IL-12(Blissら(1996) J. Immunol. 156:887-894)、IL-18、TNF- $\alpha$

、 $\beta$ 、および $\gamma$ ）、ならびに/またはトランスフォーミング成長因子(TGF)- $\alpha$ である。

ISSとともに投与されるペプチドはまた、特異的レセプターへのタンパク質結合を媒介するか、または特定の細胞型または組織に対する標的化を媒介するアミノ酸配列を含み得る。例には、抗体または抗体フラグメント、ヒト成長ホルモンのようなペプチドホルモン、および酵素が含まれるが、これらに限定されない。免疫調節ペプチドにはまた、ペプチドホルモン、ペプチド神経伝達因子、およびペプチド成長因子が含まれる。B7(CD80)のような補助的刺激分子、トランス活性化タンパク質(例えば、転写因子)、ケモカイン(例えば、マクロファージ走化性タンパク質(MCP)、ならびに他の化学誘引物質または走化性ペプチドもまた、ISSとともに投与するために有用なペプチドである。

本発明はまた、アジュバントと組み合わせたISSの投与を提供する。ISSおよびアジュバントと一緒に抗原の投与は、抗原に対する免疫応答の増強を導き、従って、ISSおよび抗原単独を含む組成物から生じる免疫応答に比較して、増強された免疫応答を生じ得る。例えば、本発明者らは、ISSおよびアジュバントと一緒に抗原の投与が、増強された一次免疫応答を導くことを示した。従って、別の実施態様において、本発明は、ISS、抗原、およびアジュバントを含む組成物を提供し、それにより、ISS/抗原/アジュバントが同時に投与される。好ましくは、免疫原性組成物は、免疫原に対する免疫応答を増強するのに十分な量のアジュバントを含む。好ましくは、アジュバントは、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、ミョウバン(アルミニウム塩)、リポソームおよび微小粒子(ポリスチレン、デンプン、ポリホスファゼン、およびポリラクチド/ポリグリコシドを含むが、これらに限定されない)を含むが、これらに限定されない。より好ましくは、ISSおよび抗原は、ミョウバンとともに同時投与される。より好ましくは、ISSおよび抗原は、リポソームとともに同時投与される。なおより好ましくは、ISSおよび抗原は、水中油エマルジョンとともに同時投与される。

適切なアジュバントはまた、スクアレン混合物(SAF-1)、ムラミルペプチド、サポニン誘導体、ミコバクテリア細胞壁調製物、モノホスホリル脂質A、ミコー

ル酸誘導体、非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤、Quil A、コレラ毒素Bサブユニット、ポリホスファゼンおよび誘導体、ならびに免疫刺激複合体(ISCAM) (例えば、Takahashiら(1990)Nature 344:873-875に記載される)、ならびに脂質ベースのアジュバントおよび本明細書中に記載される他のものが含まれるが、これらに限定されない。獣医学的使用および動物における抗体の産生については、フロイントアジュバント(完全および不完全の両方)の分裂促進的な成分が使用され得る。

全ての免疫原性組成物と同様に、成分の免疫学的に有効な量は、経験的に決定されなければならない。考慮されるべき因子には、抗原性(ISSおよび/または抗原が、免疫調節促進因子、アジュバント、またはキャリアタンパク質もしくは他のキャリアと複合体化しているか、またはそれらに共有結合により結合しているかに関わらず)、投与の経路、ならびに投与されるべき免疫化用量の数が含まれる。このような因子は、ワクチンの分野で公知であり、そして過度の実験を要さ

ずにこのような決定をするのに十分に免疫学者の技術範囲内にある。

本発明はさらに、混合物としてのISSおよび免疫調節分子が、ISSおよび免疫調節分子の投与と比較して、生成された免疫応答を増強するのに効果的な距離において近接に関連している組成物を提供する。従って、本発明は、組成物およびその使用のための方法を提供し、この組成物は、複合体が標的に対して利用可能になるまで、ISSおよび免疫調節分子の近接した結合を維持し得るカプセル化薬剤を含む。好ましくは、ISSを含む組成物、免疫調節分子、およびカプセル化薬剤は、アジュバント水中油エマルジョン、微小粒子、および/またはリポソームの形態である。より好ましくは、ISS-免疫調節分子をカプセル化するアジュバント水中油エマルジョン、微小粒子、および/またはリポソームは、約0.04  $\mu\text{m}$  ~ 約100  $\mu\text{m}$ 、より好ましくは約0.1  $\mu\text{m}$  ~ 約20  $\mu\text{m}$ 、さらにより好ましくは約0.15  $\mu\text{m}$  ~ 約10  $\mu\text{m}$ のサイズの粒子の形態である。

コロイド分散系(例えば、ミクロスフェア、ビーズ、高分子複合体、ナノカプセル、ならびに脂質ベースの系(例えば、水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソーム))は、ISSを含有する組成物の有効なカプセル化を提供

し得る。

カプセル化組成物は、任意の広範な種々の成分をさらに含む。これらには、ミョウバン、脂質、リン脂質、脂質膜構造(LMS)、ポリエチレングリコール(PEG)、および他のポリマー（例えば、ポリペプチド、糖ペプチド、および多糖）が含まれるが、これらに限定されない。

成分のカプセル化に適切なポリペプチドには、当該分野で公知の任意のものが含まれ、そして脂肪酸結合タンパク質を含むが、これに限定されない。改変されたポリペプチドには、任意の種々の改変が含まれ、グリコシル化、リン酸化、ミリスチル化、硫酸化、およびヒドロキシル化が含まれるが、これらに限定されない。本明細書中に使用されるように、適切なポリペプチドは、ISS含有組成物を保護して、その免疫調節活性を保存するものである。結合タンパク質の例には、アルブミン（例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)およびえんどう豆アルブミン）が含まれるが、これらに限定されない。

他の適切なポリマーは、薬学の分野で公知の任意のものであり得、天然に存在するポリマー（例えば、デキストラン、ヒドロキシエチルスターチ、および多糖）ならびに合成ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。天然に存在するポリマーの例には、タンパク質、糖ペプチド、多糖、デキストラン、および脂質が含まれる。さらなるポリマーは、合成ポリマーであり得る。本発明における使用のために適切な合成ポリマーの例には、ポリアルキルグリコール(PAG)（例えば、PEG）、ポリオキシエチル化ポリオール(POP)（例えば、ポリオキシエチル化グリセロール(POG)、ポリトリメチレングリコール(PTG)、ポリポリピレングリコール(PPG)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリアクリル酸、ポリエチルオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリアミノ酸、ポリウレタン、およびポリホスファゼン）が含まれるが、これらに限定されない。合成ポリマーはまた、直線状もしくは分枝状、置換されているかもしくは置換されていない、2つ以上の異なる合成モノマーのホモポリマー、コポリマー、もしくはブロックコポリマーであり得る。

PEGは、分子の広範な群を構成する。PEGについての一般式は、以下のようであ



る：
$$R_1 O-(CH_2 CH_2 O)_n-R_3$$

ここで、 $R_1$  および  $R_3$  は、独立して、 $H$ 、 $H_3C$ 、 $OH$ 、または直線状もしくは分枝状の、置換されたかもしくは置換されていないアルキル基であり、そして  $n$  は 1 と約 1,000 との間の整数である。用語「PEG」には、置換されていない ( $R_1$  および  $R_3 = H$ ) および置換された PEG の両方が含まれる。本発明のカプセル化組成物における使用のための PEG は、化学薬品供給元から購入するか、または当業者に公知の技術を使用して合成されるかのいずれかである。

本明細書中で使用される用語「LMS」は、極性脂質の極性の頭基 (head group) が、界面の水相に面し、膜構造を形成するように配置されている層状の脂質粒子を意味する。LMS の例には、リポソーム、ミセル、渦巻き (すなわち、一般的に円柱状のリポソーム)、マイクロエマルジョン、単層ベシクル、多層ベシクルなどが含まれる。

本発明の好ましいコロイド分散系は、リポソームである。リポソームカプセル化抗原で免疫したマウスにおいて、リポソームは、抗原に対する  $Th1$  型免疫応答

を増強するようであった。Aramaki ら (1995) Vaccine 13:1809-1814。本明細書中で使用される「リポソーム」または「脂質ベシクル」は、少なくとも 1 つ、そしておそらく 1 つより多くの二重層脂質膜によって結合される小さいベシクルである。リポソームは、リン脂質、糖脂質、脂質、ステロイド (コレステロール)、関連する分子、またはこれらの組み合わせから、当該分野で公知の任意の技術 (超音波処理、押出し、または脂質界面活性剤複合体からの界面活性剤の除去を含むが、これらに限定されない) によって、人工的に作製される。リポソームはまた、さらなる成分 (例えば、組織標的化成分) を任意的に含み得る。「脂質膜」または「脂質二重層」は、脂質のみからなる必要はなく、膜の一般的構造が疎水性コアを 2 つの親水性表面のシートである限り、任意の適切な他の成分 (コレステロールおよび他のステロイド、脂質可溶性化学薬品、任意の長さのタンパク質、ならびに他の両親媒性分子を含むがこれらに限定されない) をさらに含み得る。膜構造の一般的な議論については、The Encyclopedia of Molecular Biology、J. Kendrew による (1994) を参照のこと。適切な脂質については、Lasic (1993

) 「Liposomes : from Physics to Applications」 Elsevier, Amsterdamを参照のこと。

好ましくは、膜が、再現性のある質（例えば、直径）を伴って形成されることを可能にし、そしてリポソームが使用されるところで生じることが予想される要素（例えば、生理学的緩衝液および循環分子）の存在下で安定であるリポソーム組成物が選択される。好ましくは、リポソームは、保存、凍結、および薬学的賦形剤との混合による操作の効果に対して耐性である。

脂質膜構造への取りこみのために適切な脂質には、天然の、半合成のもしくは合成の、モノ-もしくはジ-グリセロリン脂質（ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルセリン(PS)、グリセロおよびカルジオリピンが含まれるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。スフィンゴミエリン(SM)およびセレブロシドのようなスフィンゴ脂質もまた、組み込まれ得る。天然のリン脂質は、sn-3位置のリン酸部分ならびにsn-1およびsn-2位置の疎水性鎖とともに生じ得るが、

合成脂質は、代替的な立体化学を、例えば、リン酸基をsn-1またはsn-2位置で有し得る。さらに、疎水性の鎖は、アシル、エーテル、アルキル、または他の結合によってグリセロール骨格に付着し得る。これらの脂質の誘導体はまた、リポソームへの取りこみに適切である。使用のために適切な誘導体には、ハロアルキル誘導体（アルキル鎖のすべてのまたはいくつかの水素原子が、例えば、フッ素で置換されているものを含む）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、コレステロールおよび他の両親媒性ステロイド、ボラ両親媒性(bolaamphiphiles)（単層膜を形成する分子のいずれかの末端に極性部分を有する脂質）、およびポリグリセロールモノアルキルエーテル(polyglycerolmonoalkylther)もまた組み込まれ得る。リポソームは、単一の脂質または2つ以上の異なる脂質の混合物から構成され得る。

1つの実施態様において、リポソームの脂質二重層は、主に、リン脂質から形成される。好ましくは、リン脂質組成物は、複雑な混合物であり、PSおよびさら

なる脂質（例えば、PC、PA、PE、PG、およびSM、PI、ならびに/またはカルジオン（ジホスファチジルグリセロール））の組み合わせを含む。所望であれば、SMは、より大きな比率のPC、PE、またはこれらの組み合わせで置換され得る。PSは、必要に応じて、PGで置換され得る。組成物は、LMSに、保存および投与の両方の間の安定性を付与するように選択される。

当業者は、前記のリストの各リン脂質が、リン脂質のグリセロール部分にエステル化された脂肪酸部分に依存してその構造が変化し得ることを容易に理解する。一般に、ほとんどの市販の形態の特定のリン脂質が使用され得る。しかし、特定の脂肪酸部分を含むリン脂質は、特定の適用について好ましくあり得る。

ISS含有組成物を含有するリポソームを調製するための一般的なプロセスは、以下の通りである。リポソームの水性の分散液は、リン脂質（例えば、PS、PC、PG、SM、およびPE）および糖脂質のような膜成分から、任意の公知の方法に従って調製される。例えば、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980)を参照のこと。リポソームはさらに、ステロール、ジアルキルホスフェート、ジアシルホスファチジン酸、ステアリルアミン、 $\alpha$ -トコフェノールなどを、リポソーム膜中に含み得る。

このように調製されたリポソーム分散液に、ISS含有組成物の水性溶液が添加され、そしてその混合物は、所定の時間、好ましくは、膜の相転移温度より上の温度に暖められながら、または40℃より上に暖められながら静置され、その後冷却され、それによりリポソーム膜中にISS含有組成物を含有するリポソームを調製する。

あるいは、所望のリポソームはまた、上記の膜成分およびISS含有組成物を予め混合させ、そしてその混合物をリポソームの調製についての公知の方法に従って処理することによって調製され得る。

脂質ベシクルは、当該分野で公知の任意の適切な技術によって調製され得る。方法には、ミクロカプセル化、ミクロフルイダイゼーション、LLC法、エタノール注入、フレオン注入、「バブル」法、界面活性剤透析、水和、超音波処理、および逆相エバポレーションが含まれるが、これらに限定されない。Watweら（199

5) Curr. Sci. 68:715-724に総説される。例えば、超音波処理および透析法は、一般に、小さい単層のベシクルを生成する；押出しおよび逆相エバポレーションは、一般に、より大きなベシクルを生成する。技術は、最も望ましい性状を有するベシクルを提供するために組み合わせられ得る。

必要に応じて、LMSはまた、膜の硬さを改善するためにステロイドを含む。ステロイドの任意の量が使用され得る。適切なステロイドには、コレステロールおよびコレスタノールが含まれるが、これらに限定されない。膜の硬さを増大させるために使用され得る他の分子には、架橋リン脂質が含まれるが、これらに限定されない。

インビボでの使用に好ましい他のLMSは、細網内皮性系（これは、通常、天然ではない物質を貪食し、そして破壊する）を回避する増強された能力を有し、それにより、リポソームに標的細胞に到達するためにより長い期間を与えるものである。この点に関して効果的な脂質組成物は、SMおよびコレステロール、またはSMおよびPIの大きな比率を有するものである。延長された循環時間を有するLMSはまた、モノシアログングリオシドGM1、グルクロニド、またはPEGを含むものを含む。

本発明は、組織または細胞標的化成分を含むLMSを包含する。このような標的

化成分は、インタクトな動物、器官、または細胞培養物に投与される場合、他の組織または細胞部位より優先し、特定の組織または細胞部位でのその集積を増強する、LMSの成分である。標的化成分は、一般にリポソームの外側から接近可能であり、そしてそれゆえ、好ましくは、外面に結合しているかまたは外側脂質二分子膜に挿入されるかのいずれかである。標的化成分は、特にペプチド、より大きなペプチドのある領域、細胞表面分子もしくはマーカーに特異的な抗体、またはそれらの抗原結合フラグメント、核酸、炭水化物、複合体炭水化物のある領域、特別の脂質、あるいは薬物、ホルモンまたは前記分子のいずれかに付着されるハプテンのような低分子であり得る。細胞型特異的細胞表面マーカーへの特異性を有する抗体は、当該分野で公知であり、そして当該分野で公知の方法によって容易に調製される。

LMSは、治療処置が指向されるべき（例えば、免疫応答を調節しそして/または免疫応答に関与し得る細胞型）に任意の細胞型標的化され得る。このような標的細胞および器官は、マクロファージ、樹状細胞およびリンパ球のようなAPC、リンパ節および脾臓のようなリンパ構造、および非リンパ構造（特に、樹状細胞が見出される構造）を含むが、これらに限定されない。

本発明のLMS組成物は、さらに界面活性剤を含み得る。界面活性剤はカチオン性、アニオン性、両親媒性、または非イオン性であり得る。界面活性剤の好ましいクラスは、非イオン性界面活性剤である；水溶性である界面活性剤が特に好ましい。非イオン性、水溶性界面活性剤は、脂肪性アルコールのポリオキシエチレン誘導体、脂肪性アルコールの脂肪酸エステルおよびグリセリルエステルを含み、ここで、ポリオキシエチレン基は、アルコール基へエーテル結合を介して結合している。例は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンひまし油誘導体、ポリオキシエチレン硬化ひまし油誘導体、および脂肪酸ナトリウム塩、コール酸ナトリウム、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテルを含むが、これらに限定されない。

本発明に包含されるLMS組成物は、ミセルを含む。本明細書で使用されるような用語「ミセル」とは、特定の温度（クラフト点）または特徴的な濃度、臨界ミセル濃度（cmc）を超える水溶液中で界面活性剤(tenside)分子から形成する凝集

体を意味する。cmcを超える場合、モノマー濃度は、実際には、一定なままであり、そして過剰の界面活性剤(tenside)分子がミセルを形成する。ミセルとは、界面活性剤物質の熱力学的に安定な会合コロイドである。ここで、モノマーの疎水性ラジカルは、凝集体の内側に位置し、疎水性相互作用によって結合される；親水基が水に面し、そして溶媒和によってコロイドの可溶性を提供する。ミセルは、界面活性剤(tenside)の化学的構成および溶液の温度、濃度またはイオン強度に依存して、種々の形状（球状、棒状、円盤状）を生じる。cmcへの到達は、表面張力、浸透圧、電導率および粘性の突然の変化により明らかになる。

ISS含有組成物を含むミセルを調製するためのプロセスは、以下のとおりである。ミセル形成界面活性剤（例えば、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エス

テル、ポリオキシエチレンひまし油誘導体、ポリオキシエチレン硬化ひまし油誘導体、および脂肪酸ナトリウム塩、コール酸ナトリウム、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルグリコシド)は、ミセル分散物を調製するために、cmcを超える濃度で水に添加される。ミセル分散物に対して、ISS含有組成物の水溶液が添加され、そしてその混合物は、所定の時間の間、好ましくは40℃以上の加熱下で、続いて、冷却下で静置され、それによって、ミセル膜にISS含有組成物を含むミセルを調製する。あるいは、所望のミセルはまた、上記のミセル形成物質とISS含有組成物とを予め混合し、そしてミセル形成について公知の方法に従ってその混合物を処理することによって、調製され得る。

### ISS合成

#### a) ISS

ISSは、当該分野で周知の技術および核酸合成装置（これらは、酵素的な方法、化学的方法、およびより大きなオリゴヌクレオチド配列の分解を含むが、これらに限定されない）を使用して合成され得る。例えば、Ausubelら(1987)；およびSambrookら(1989)を参照のこと。酵素的に構築される場合、個々の単位は、例えばT4 DNAまたはRNAリガーゼのようなリガーゼで連結され得る。米国特許第5,124,246号。オリゴヌクレオチドの化学的合成には、従来の自動化方法（例えば、Warnerら(1984) DNA 3:401によって開示されるホスホルアミダイト法）が含まれ得る。米国特許第4,458,066号もまた参照のこと。オリゴヌクレオチド分解は、米国特許第4,650,675号で例示されるような、ヌクレアーゼへのオリゴヌクレオチドの曝露によって達成され得る。

ISSはまた、従来のポリヌクレオチド単離手順を使用して単離され得る。このような手順は、共有されるヌクレオチド配列を検出するためのプローブとゲノムまたはcDNAライブラリーとのハイブリダイゼーション、共有される構造上の特徴を検出するための発現ライブラリーの抗体スクリーニング、およびポリメラーゼ連鎖反応による特定のネイティブ配列の合成を含むが、これらに限定されない。

環状ISSは単離され得るか、組換え方法によって合成されるかまたは化学的に

合成され得る。環状ISSが単離方法または組換え方法によって得られる場合、好ましくはISSはプラスミドである。より小さな環状オリゴヌクレオチドの化学的合成は、文献に記載される任意の方法を使用して実施され得る。例えば、Gaoら (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2025-2029 ; およびWangら (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:2326-2333を参照のこと。

ISSはまた、亜リン酸ベースの改変されたオリゴヌクレオチドを含み得る。これらは標準的な化学的変態を使用して合成され得る。メチルホスホネートの効率的な固体支持に基づく構築もまた記載されている。ホスホトリエステル(Millerら (1971) *JACS* 93:6657-6665)、ホスホルアミデート(Jagerら (1988) *Biochem.* 27:7247-7246)、およびホスホロジチオエート(米国特許第5,453,496号)のような他の亜リン酸ベースの改変されたオリゴヌクレオチドの合成もまた記載されている。他の非亜リン酸ベースの改変されたオリゴヌクレオチドもまた使用される。Stirchakら (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:6129-6141。

オリゴヌクレオチドに対してリン酸基改変を作製するための技術は、当該分野で公知である。1つのこのような有用な技術の総説のために、標的オリゴヌクレオチド産物のための中間体リン酸トリエステルが調製され、そして水性ヨウ素または他の薬剤(例えば、無水アミン)を用いて天然に存在するリン酸トリエステルに酸化される。得られるオリゴヌクレオチドホスホルアミデートは、ホスホロジチオエートを産生するために硫黄で処理され得る。同じ一般的技術(硫黄処理工

程を除いて)がメチルホスホネートからメチルホスホアミダイトを産生するために適用され得る。米国特許第4,425,732号;同第4,458,066号;同第5,218,103号;および同第5,453,496号もまた参照のこと。

塩基改変ヌクレオシドの調製、および前駆体として前記塩基改変ヌクレオシドを使用する改変されたオリゴヌクレオチドの合成は、例えば、米国特許第4,910,300号,同第4,948,882号;および同第5,093,232号に記載されている。これらの塩基改変ヌクレオシドは、化学合成によって、オリゴヌクレオチドの末端位置または内部位置のいずれかに組み込まれ得るように設計される。オリゴヌクレオチドの末端位置または内部位置のいずれかに存在する、このような塩基改変ヌクレオ

シドは、ペプチドまたは他の抗原の付着のための部位として働き得る。糖部分を改変されたヌクレオシドもまた、記載（例えば、これらは米国特許第4,849,513号、同第5,015,733号、同第5,118,800号、同第5,118,802号を含むが、これらに限定されない）され、そして同様に使用され得る。

#### b) 免疫調節分子

弱毒化および不活化したウイルスは、抗原として本明細書における使用のために適切である。これらのウイルスの調製は、当該分野で周知である。ポリオウイルスは、 $\beta$ プロピオラク톤のような化学的薬剤によって不活化され得る。Jiangら(1986)。A型肝炎ウイルスの弱毒化株の増殖は、記載され (Bradleyら、(1984))、そして弱毒化麻疹ウイルスの増殖も記載されている (Jamesら、(1995))。さらに、弱毒化および不活化ウイルス（例えば、HIV-1、HIV-2、単純ヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルス、ロタウイルス、ヒトおよび非ヒトパピローマウイルスおよびスローブレインウイルス）は、ペプチド抗原を提供し得る。

アレルゲンは、免疫調節分子として本明細書における使用のために適切である。多くのアレルゲンの調製は、当該分野で周知であり、ブタクサ花粉アレルゲン抗原E (Amb al) (Rafnarら1991)、主要粉塵ダニアレルゲンDer pIおよびDer pII (Chuaら(1988) : およびChuaら(1990))、シラカバ花粉Bet vI (Brecitnederら1989)、イエネコアレルゲンFel dI (Rogersら(1993)、および木の花粉からのタンパク質抗原 (Elsayedら(1991))の調製を含むが、これらに限定されない。インビボ投与

のための草花粉由来のタンパク質抗原の調製が報告されている。Malley(1989)。

免疫調節ペプチドは、ネイティブであり得るかまたはは化学的もしくは酵素的に合成され得る。当該分野で公知である化学的合成の任意の方法が、適切である。溶液相ペプチド合成が中程度のサイズのペプチドの構築のために使用され得、またはペプチドの化学的構築のためには、固相合成が使用され得る。Athertonら (1981) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 362:833-839。タンパク質分解性酵素もまた、ペプチドを産生するようにアミノ酸を結合するために利用され得る。Kullmann (1987) Enzymatic Peptide Synthesis, CRC Press, Inc.。あるいは、ペプチドは、細胞の生化学的機構を使用することによって、または生物学的供給



源からの単離によって得られ得る。組換えDNA技術は、ペプチドの産生のために使用され得る。Hamesら、(1987) *Transcription and Translation: A Practical Approach*, IRL Press。ペプチドはまた、アフィニティークロマトグラフィのような標準的技術を使用して単離され得る。

好ましくは、抗原は、ペプチド、脂質（例えば、ステロール、脂肪酸、およびリン脂質）、H. インフルエンザワクチンに使用されるようなポリサッカライド、ガングリオシドおよび糖タンパク質である。これらは、単離、ならび化学的方法および酵素的方法を使用する、合成を含む、当該分野で公知のいくつかの方法によって得られ得る。特定の場合（例えば、多くのステロール、脂肪酸およびリン脂質についての場合）、分子の抗原部分は市販されている。

#### c) ISS-免疫調節分子結合体

ISS部分は、共有的相互作用および/または非共有的相互作用を含む、種々の方法で、結合体の免疫調節分子部分と結合され得る。

部分間の連結は、ISSの3'末端もしくは5'末端で、またはISSの内部位置の適切に改変された塩基でなされ得る。免疫調節分子がペプチドであり、そして適切な反応性基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）を含む場合、これは、シトシン残基のN<sup>4</sup>アミノ基と直接反応され得る。ISS中のシトシン残基の数および位置に依存して、1つ以上の残基での特異的標識が、達成され得る。

あるいは、当該分野で公知のような、改変されたオリゴヌクレオシドが、ISS

中の末端または内部位置のいずれかに組み込まれ得る。これらは、ブロックされた官能基を含み得、脱ブロックされる場合、これは種々の官能基（これは、目的の免疫調節分子に存在し得るか、またはこれと結合され得る）と反応性である。

免疫調節分子がペプチドである場合、結合体のこの部分は、固体支持体化学によってISSの3'末端に結合され得る。例えば、ISS部分は、支持体上で予め合成されたポリペプチド部分に付加され得る。Haralambidisら (1990a) *Nucleic Acids Res.* 18:493-499; およびHaralambidisら (1990b) *Nucleic Acids Res.* 18:501-505。あるいは、ISSは、3'末端から伸張している切断可能なリンカーを通して固体支持体へ連結されるように合成され得る。支持体からISSの化学的切断

の際、末端チオール基が、オリゴヌクレオチドの3'末端に残されるか(Zuckermannら(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:5305-5321; およびCoreyら(1987) *Science* 238:1401-1403)、あるいは末端アミン基が、オリゴヌクレオチドの3'末端に残される(Nelsonら(1989) *Nucleic Acids Res.* 17:1781-1194)。ペプチドのアミノ基へのアミノ改変されたISSの結合は、Benoitら(1987) *Neuromethods* 6:43-72に記載されるように実施され得る。ペプチドのカルボキシル基へのチオール改変ISSの結合は、Sinahら(1991) *Oligonucleotide Analogues: A Practical Approach*, IRL Pressに記載されるように実施され得る。ペプチドのシステイン残基のチオール側鎖への、付加されたマレイミドを有するオリゴヌクレオチドの結合もまた、記載されている。Tungら(1991) *Bioconjug. Chem.* 2:464-465。

結合体のペプチド部分は、合成の間にオリゴヌクレオチドへ組み込まれたアミン、チオール、またはカルボキシル基によって、ISSの5'末端へ結合され得る。好ましくは、オリゴヌクレオチドが固体支持体へ固定されるが、一方の末端に保護されたアミン、チオールまたはカルボキシルを含み、他方にホスホルアミダイトを含む連結基は、5'ヒドロキシルに共有結合される。Agrawalら(1986) *Nucleic Acids Res.* 14:6227-6245; Connolly(1985) *Nucleic Acids Res.* 13:4485-4502; Kremskyら(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:2891-2909; Connolly(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:3131-3139; Bischoffら(1987) *Anal. Biochem.* 164:336-344; Blanksら(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10283-10299; および米国特許第4,849,513号、同第5,015,733号、同第5,118,800号、および同第5,118,802号。

脱保護に続いて、潜在的なアミン、チオールおよびカルボキシル官能性は、ペプチドへのオリゴヌクレオチドの共有結合のために使用され得る。Benoitら(1987); およびSinahら(1991)。

ペプチド部分は、ISSの任意の位置で改変されたシトシンまたはウラシルに結合され得る。改変された塩基のC-5での、潜在的反応性官能性(例えば、アミンまたはカルボキシル基)を有する「リンカーアーム」の組み込みは、ペプチド連結のためのハンドルを提供する。Ruth, 4th Annual Congress for Recombinant DNA Research, 123頁。

ISS免疫調節分子結合体はまた、非共有的相互作用（例えば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合および/またはファンデルワールス力）によって形成され得る。

非共有的に連結された結合体は、ビオチン-ストレプトアビジン複合体のような非共有的相互作用を含み得る。ビオチニル基は、例えば、ISSの改変塩基に結合され得る。Rogetら (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7643-7651。ペプチド部分へのストレプトアビジン部分の組み込みは、ストレプトアビジン結合ペプチドとビオチン化オリゴヌクレオチドの非共有結合複合体の形成を可能にする。

非共有的会合はまた、ISSおよび免疫調節分子内の残基（例えば、荷電アミノ酸）を含むイオン性相互作用によって、またはオリゴヌクレオチドおよび免疫調節分子の両方と相互作用し得る、荷電した残基を含むリンカー部分の使用によって生じ得る。例えば、非共有結合は、全体的に、負に荷電したISSと、ペプチドの正荷電アミノ酸残基（例えば、ポリリジンおよびポリアルギニン残基）との間に生じ得る。

ISSと免疫調節分子との間の非共有結合は、天然のリガンドとしてのDNAと相互作用する分子のDNA結合モチーフによって生じ得る。例えば、このようなDNA結合モチーフは、転写因子と抗DNA抗体に見出され得る。

脂質へのISSの連結は、標準的な方法を使用して形成され得る。これらの方法は、オリゴヌクレオチド-リン脂質結合体(Yanagawaら (1988) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 19:189-192)、オリゴヌクレオチド-脂肪酸結合体(Grabarekら (1990) *Anal. Biochem.* 185:131-135 ; およびStarosら (1986) *Anal Biochem.* 156:220-

222)、およびオリゴヌクレオチド-ステロール結合体の合成を含むが、これらに限定されない。Boujradら (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:5728-5731。

オリゴサッカライドへのオリゴヌクレオチドの連結は、標準的な公知の方法を使用して形成され得る。これらの方法は、オリゴヌクレオチド-オリゴサッカライド結合体（ここで、オリゴサッカライドは、イムノグロブリンの部分である）を含むが、これらに限定されない。O' Shannessyら (1985) *J. Applied Biochem.* 7:347-355。

ペプチドまたは抗原への環状ISSの連結は、いくつかの方法で形成され得る。環状ISSが組換え方法または化学的方法を使用して合成される場合、改変されたヌクレオシドが適切である。Ruth (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press。次いで、標準的な連結技術が、抗原または他のペプチドへ環状ISSを連結するために使用され得る。Goodchild (1990) *Bioconjug. Chem.* 1:165。環状ISSが単離される場合、または組換え方法もしくは化学的方法を使用して合成される場合、連結は抗原または他のペプチドに組み込まれている反応基（例えば、カルベン、ラジカル）を化学的活性化または光活性化することによって形成され得る。

オリゴヌクレオチドへのペプチドおよび他の分子の結合のためのさらなる方法は、米国特許第5,391,723号；Kessler (1992) 「Nonradioactive labeling methods for nucleic acids」Kricka (編) *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press；およびGeogheganら (1992) *Bioconjug. Chem.* 3:138-146に見出され得る。

#### ISSに対する免疫応答の評価

ISS含有組成物への免疫応答の分析（定性および定量の両方）は、当該分野で公知である任意の方法によってされ得、抗原特異的抗体産生、CD4<sup>+</sup>T細胞またはNK細胞のようなリンパ球の特定集団の活性化、および/またはIFN、IL-2、IL-4、またはIL-12のようなサイトカインの産生の測定を含むが、これらに限定されない。特異的抗体応答を測定するための方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を含み、そして当該分野で周知である。CD4<sup>+</sup>T細胞のような特定の型のリンパ

球の数の測定は、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)で達成され得る。細胞傷害性アッセイは、例えば、Razら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519-9523に記載されるように実施され得る。サイトカインの血清濃度は、例えば、ELISAによって測定され得る。免疫原への免疫応答を評価するためのこれらのアッセイおよび他のアッセイは当該分野で周知である。例えば、*Selected Methods in Cellular Immunology* (1980) MishellおよびShiigi編、W.H. Freeman and Co.を参照のこと。

## ISSの投与

ISSは、単独でまたは、他の医薬品および/または免疫原性薬剤および/または免疫賦活性薬剤と組み合わせて投与され得、そしてそれらの生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせられ得る。特定のISS処方物の有効量および投与方法は、個々の患者、および疾患の段階および当業者に明らかな他の因子に基づいて変化し得る。特定の適用に有用な投与経路は、当業者に明らかである。投与経路は、局所的、皮膚、経皮、経粘膜、表皮非経口、消化管、および鼻咽頭、ならびに経気管支および経肺胞を含む肺を含むが、これらに限定されない。適切な投薬量範囲は、血液レベルによって測定される約 $1 \sim 10 \mu\text{M}$ の組織濃度に達するに十分なISS含有組成物を提供する投薬量範囲である。各患者に与えられる絶対量は、バイオアベイラビリティ、クリアランス速度、および投与経路のような薬理学的特性に依存する。

本明細書に記載されるように、APCおよび高濃度のAPCを有する組織が、ISS含有組成物の好ましい標的である。従って、啮乳動物皮膚および/または粘膜（ここで、APCは比較的高濃度で存在する）へのISSの投与が、好ましい。

本発明は、生理学的に受容可能な移植体、軟膏剤、クリーム、リンスおよびゲルを含むがこれらに限定されない、局所的適用のために適切なISS含有組成物を提供する。局所投与は、例えば、そこに送達システムが配置されている包帯（ドレッシングまたはバンテージ）によって、あるいは切開または開放創への送達システムの直接投与による。ISS含有組成物が配置されているクリーム、リンス、ゲル、または軟膏剤は、局所的な軟膏剤または創傷充填薬剤としての使用のため

に適切である。

経皮投与の好ましい経路は、侵襲性が最も少ない経路である。これらの中の好ましい手段は、経皮伝達、表皮投与および皮下注射である。これらの手段の中で、表皮投与が、皮内組織に存在することが予測される、より高濃度のAPCのために好ましい。

経皮投与は、ISS含有組成物が皮膚に浸透し、そして血流に侵入することを可能にし得る、クリーム、リンス、ゲルなどの適用によって達成される。経皮投与

のために適切な組成物は、皮膚に直接適用されるか、あるいは経皮デバイス（いわゆる「パッチ」）のような保護キャリアへ組み込まれる薬学的に受容可能な懸濁液、オイル、クリーム、および軟膏を含むが、これらに限定されない。適切なクリーム、軟膏などの例は、例えば、Physician's Desk Referenceで見出され得る。

経皮伝達のためには、イオントフォレーシスが適切な方法である。イオントフォレーシスによる伝達は、市販パッチ（これは、数日またはそれ以上の期間の間、未破壊の皮膚を通して、その生成物を連続的に送達する）を使用して達成され得る。この方法の使用は、比較的高濃度の医薬組成物の制御された伝達を可能にし、併用薬物の注入を許容し、そして吸収促進因子の同時使用を可能にする。

この方法に使用するための例示的なパッチ製品は、General Medical Company (Los Angeles, CA) のLECTRO PATCHという商標の製品である。この製品は、中性pHにリザーバー電極を電氣的に保持し、そして異なる濃度の投薬を提供し、連続的におよび/または周期的に投与するように適合され得る。パッチの調製および使用は、LECTRO PATCH製品に添付された製造者の印刷した説明書（これらの説明書は、参考として本明細書中で援用される）に従って実施されるべきである。

経皮伝達のためには、低周波超音波送達もまた、適切な方法である。Mitragotriら(1995) Science 269:850-853。低周波超音波周波数（約1MHz）の適用は、治療組成物（これは、高分子量の組成物を含む）の、一般的な制御された送達を可能にする。

表皮投与は、刺激物に対して免疫応答を引き起こすために十分に表皮の最も外側の層を機械的または化学的に刺激することを本質的に含む。詳細には、刺激は、刺激部位にAPCを誘引するのに十分であるべきである。

機械的刺激手段は、複数の非常に小さな直径の短い尖叉（これは、尖叉の端から移されたISS含有組成物を取り込むように、皮膚を刺激し、そして刺激部位へAPCを誘引するためのに使用され得る）を使用する。例えば、Pasteur Merieux（リヨン、フランス）によって製造されたMONO-VACCI旧ツベルクリン試験は、ISS含有組成物の導入のために適切なデバイスを含む。

デバイス（これは、Swiftwater、PAのConnaught Laboratories, Inc.によって米国で販売されている）は、一方の末端にシリンジプランジャーを、他方の末端に尖叉ディスクを有するプラスチック容器からなる。尖叉ディスクは、表皮細胞の最も外側の層をちよっと引っ掻く長さの小さな直径の複数の尖叉を支持する。MONO-VACCキットの各尖叉は、旧ツベリクリンでコートされでいる；本発明において、各針は、ISS含有組成物の薬学的組成物でコートされる。このデバイスの使用は、好ましくは、デバイス製品と共に含まれる製造者の書面による説明書に従う。同様のデバイス（これもまた、この実施態様において使用され得る）は、アレルギー試験を実施するために現在使用されるデバイスである。

ISSの上皮投与に対する別の適切なアプローチは、表皮の最も外側の細胞を刺激する化学物質の使用により、十分な免疫応答を引き起こして領域に対してAPCを誘引することである。例は、Noxema CorporationによりNAIRの商標のもとで販売される市販の局所的な脱毛クリームにおいて使用されるサリチル酸のようなケラチン分解性薬剤（keratinolytic agent）である。このアプローチはまた、粘膜における上皮投与を達成するために使用され得る。化学刺激剤はまた、（例えば、MONO-VACC型枝（tine）もまた化学刺激剤で被膜される場合に生じるような）機械的な刺激剤と組み合わせて適用され得る。ISSは、化学刺激剤もまた含むキャリア中に懸濁され得るか、またはキャリアと共に投与され得る。

ISS含有組成物を投与するための別の送達方法は、合成ポリカチオン性アミノポリマーのような非脂質ポリマーを使用する。Leff (1997) Bioworld 86:1-2。

投与の非経口経路には、のような電氣的（イオン注入）もしくは中心静脈系統への直接注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射、または皮下注射のような直接注入が含まれるがこれらに限定されない。非経口投与に適切な組成物には、薬学的に受容可能な滅菌等張溶液が含まれるがこれに限定されない。

このような溶液には、ISS含有組成物の注射のための、生理食塩水およびリン酸緩衝化生理食塩水が含まれるがこれらに限定されない。

投与の消化管経路には、摂取および直腸が含まれるがこれらに限定されない。本発明は、消化管投与に適切なISS含有組成物を含み、これは摂取のための薬学

的に受容可能な粉末、丸剤、または液体および直腸投与のための坐薬を含むがこれらに限定されない。

投与の鼻咽頭および肺経路には、吸入、経気管支性経路、および経肺胞経路が含まれるがこれらに限定されない。本発明は、吸入投与に適切なISS含有組成物を含み、これは吸入のための種々のタイプのエアロゾル、ならびに送達系のための粉末形態を含むがこれらに限定されない。ISS含有組成物の吸入投与に適切なデバイスは、噴霧器および蒸発器が含まれるがこれらに限定されない。粉末で満たされた噴霧器および蒸発器は、粉末の吸入送達においての使用に適切な種々のデバイスのうちの1つである。例えば、Lindberg (1993) Summary of Lecture at Management Forum 6-7 December 1993 「Creating the Future for Portable Inhalers」を参照のこと。

注射、局所的適用、噴霧器、および蒸発器に適切なデバイスを産生する方法は、当該分野で公知であり、詳細には記載しない。

送達経路の選択は、誘発される免疫応答を調節するのに使用され得る。例えば、IgG力価およびCTL活性は、インフルエンザウイルスベクターが筋肉内経路または上皮（遺伝子銃）経路を介して投与された場合に同一であった；しかし、筋肉接種は主にIgG2Aを生じるのに対し、上皮経路はほとんどIgG1を生じた。Pertmerら (1996) J. Virol. 70. 6119-6125。従って、当業者は、本発明の免疫調節オリゴヌクレオチドを投与する異なる経路によって誘発される、免疫原性におけるわずかな差異を利用し得る。

上記の組成物および投与の方法は、本発明のISS含有組成物を投与する方法を記載することを意味するが、限定されない。種々の組成物およびデバイスを産生する方法は、当業者の能力の範囲内であり、本明細書中に詳細には記載されない。

。

#### ISSについてのスクリーニング

本発明はまた、ISSの免疫調節活性についてスクリーニングする方法を提供する。特に、提供される方法は、インビボでTh1型免疫応答を刺激する能力についてのISSのインビトロスクリーニングを可能にする。実施例6に記載のように、



スクリーニング方法は、マウス細胞株(例えば、P388D.1)またはヒト細胞株(例えば、90196.B.)のいずれかの使用を含み得る。これらの細胞株の、潜在的なISS活性を有するオリゴヌクレオチドでの処置、および続く、処置した細胞からのサイトカイン産生の決定は、インビボで投与された場合のオリゴヌクレオチドの免疫刺激活性に関する確実な指標を提供した。細胞株(例えば、P388D.1および/または90109.B.)の使用は、オリゴヌクレオチド組成物の効果が測定され得る容易に利用可能な一貫した細胞集団を可能にする。一般的には、サイトカイン(例えば、IL-6および/またはIL-12)産生を刺激する0.1~10 $\mu$ g/mlの範囲の濃度から2ng/mlを越える濃度で培養上清中に投与されたオリゴヌクレオチドは、48~72時間後に、免疫調節活性を示す。このような評価をもたらすのに有用なインビトロ技術についての詳細は、実施例に記載される;当業者にはまた、本明細書中に教示されるパラメーターに沿って、サイトカイン分泌および抗体産生を測定するほかの方法を知っているか、または容易に確認し得る。

以下の実施例は、本発明を例示するために提供されるが限定しない。

#### 実施例

##### 実施例1

##### ISSオクタヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドによる

##### サイトカイン産生の刺激

上記のように、ポリヌクレオチドにおけるISS活性を、最初に、非メチル化CpGジヌクレオチドを含むDNAと関連付けた。ISSエレメントを、ヘキサマー配列、好ましくは配列5'-プリン、プリン、C、G、ピリミジン、ピリミジン-3'としてさらに規定した(Kriegら(1995))。不運なことに、免疫刺激活性を予測するヘキサマー配列によると、ほとんどの場合、不活性オリゴヌクレオチドを生じる。しかし、本明細書中に提供されるさらなる実験は、ISSヘキサマーの周囲のヌクレ

オチドは、ISSエレメントに関連する免疫刺激活性に有意に寄与し得ることを示す。特に、特定のISS配列は、Th1型免疫応答を刺激することが同定されている。このようなISSエレメントを同定した実験を、以下に記載する。

150を越える異なるオリゴヌクレオチド(例えば表1を参照のこと)を、マウ

ス脾細胞および／またはヒト末梢血単核細胞（hPBMC）における免疫刺激活性について試験した。オリゴヌクレオチドに対する応答における免疫刺激を、培養培地へのサイトカイン分泌の測定、および細胞増殖によって評価した。培養上清におけるサイトカインレベルを、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）試験によって決定した。

オリゴヌクレオチドを、標準的な固相オリゴヌクレオチド技術を用いて合成した。固相用アナログモノマー（solid phase ready analog monomer）を、Glen Research, Sterling, VAから購入し、そして標準的な様式で固相オリゴヌクレオチド合成器に含めた。オリゴヌクレオチドの合成を、TrLink Bio Technologies Inc., San Diego, CAによって行った。

細胞を、標準的な技術を用いて単離し、そして調製した。hPBMCを、健常ドナー由来のヘパリン処理した末梢血から、フィコールージアトリゾ酸ナトリウム勾配によって単離した。BALB/cマウスの脾臓を採取し、そして脾細胞を標準的な掻き裂き法（teasing）を用いて、そしてBioWhittaker, Inc. からのACK溶解緩衝液で処理して単離した。単離した細胞を、2%熱非働化ウシ胎児血清（FCS）、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、および2 mM L-グルタミンを補充したRPMI 1640培地で洗浄し、そして10%FCS/RPMI（10%熱非働化FCS、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、および2 mM L-グルタミンを含むRPMI 1640培地）に、約  $4 \times 10^6$  細胞/mlで再懸濁した。

一般的には、細胞培養を、細胞を含む10%FCS/RPMI 100  $\mu$  l 中に96ウェルのフラットマイクロタイタープレートにおいて、約  $4 \times 10^5$  細胞/ウェルで三連に設定した（プレーティング後少なくとも1時間静置させた）。オリゴヌクレオチド活性アッセイのために、オリゴヌクレオチドを10%FCS/RPMIで希釈し、そして所望のオリゴヌクレオチド希釈物の100  $\mu$  lを、適切なウェルに添加した。一般的には、

最終オリゴヌクレオチド濃度は、0.1  $\mu$ g/ml、1.0  $\mu$ g/ml、および10  $\mu$ g/mlを含んだ。次いで、細胞を、1、2、または3日間インキュベートした。

細胞増殖を測定するために、100  $\mu$ lの上清を、適切な日に各ウェルから採取し、1.0  $\mu$ Mの滴定したチミジンでパルスし、そして一晩インキュベートした。滴定したチミジンの取り込みを評価するための標準的な方法を使用して、細胞増殖を測定した。細胞によるサイトカイン産生を、サイトカインに対する市販の抗体を用いて、培養上清のELISAによって測定した。

このような実験の結果を、図1～3において図示する。使用したオリゴヌクレオチドは以下を含んだ：

表 1

配列番号	オリゴヌクレオチド配列	
1	tgaccgtgaacgttcgagatga	ISS (本字, 下線)
2	tgactgtgaacgttcgagatga	ISS
3	tgactgtgaaggtagagatga	
4	tcactcgaacgttcacagtca	ISS
5	tcactcgaacgttcacggtca	
6	tgactgtgaacgttcagatga	ISS
7	tcataacgttcgctaacgttcgtc	2 x ISS
8	tgactgtgaacgttagcgatga	
9	tgactgtgaacgttagacgtga	
10	tgacgtgaacgttagagatga	
11	tgactcgtgaacgttagagatga	

これらの実験で使用した全てのオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格を含んだ。

図1～3に示されるように、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド1、2、および7（それぞれ、配列番号1、配列番号2、および配列番号7）は、マウス脾細胞からのIL-12、IFN- $\gamma$ 、およびIL-6の分泌の強力な刺激因子である。これらのオリゴヌクレオチドはまた、hPBMCからのサイトカイン分泌を刺激する。全ての3つのこれらのオリゴヌクレオチドは、5'-プリン、プリン、シトシン、グアノシン、ピリミジン、ピリミジン、シトシン、グアノシン-3'の好ましいオク

タヌクレオチド配列を含む（表1を参照のこと）。

免疫刺激活性を有するさらなるオリゴヌクレオチドの例としては、オリゴヌク

レオチド4および6（配列番号4および配列番号6）が挙げられる。これらの免疫刺激オリゴヌクレオチドはまた、好ましいオクタヌクレオチド配列を含む（表1を参照のこと）。図1～3および表1はまた、オリゴヌクレオチドにおけるヘキサマーISSエレメント（5'-プリン、プリン、C、G、ピリミジン、ピリミジン-3'としてKriegら（1995）によって規定される）の含有は、オリゴヌクレオチドについての免疫刺激活性の確実な予測ではなかったことを示した。例えば、オリゴヌクレオチド5、および8～11を参照のこと。

### 実施例2

#### 修飾された塩基を含むISSによるサイトカイン産生の刺激

修飾された塩基を含むいくつかのオリゴヌクレオチドを、マウス脾細胞およびhPBMCにおける免疫刺激活性について試験した。オリゴヌクレオチドに対する応答における免疫刺激を、上記のように、培養培地へのサイトカイン分泌の測定、および細胞増殖によって評価した。細胞培養およびオリゴヌクレオチド活性アッセイを、上記のように設定し、そして行った。

表2

配列番号	オリゴヌクレオチド配列	
2	tgactgtgaacggttcgagatga	ISS (太字, 下線)
12	tgactgtgaabggttcgagatga	b=5- プロモシトシン
13	tgactgtgaagcttagagatga	ISSなし
14	tcactctcttccttactcttct	ISSなし
15	tgactgtgaabggttcgagatga	b=5- プロモシトシン
16	tgactgtgaabggttcgagatga	b=5- プロモシトシン
17	tccatg <b>abggttcg</b> tgatcgt	b=5- プロモシトシン
18	tccata <b>abggttc</b> ctgatgct	b=5- プロモシトシン
19	tccata <b>abggttcg</b> tgatgct	b=5- プロモシトシン
20	tccata <b>abggttcgccta</b> acggttcg	b=5- プロモシトシン
21	tccata <b>abggttcgccta</b> abggttcg	b=5- プロモシトシン

図4～6は、マウス脾細胞を表2（ここでbは、5-プロモシトシンであり、そしてISSオクタマー配列は、太字および下線を付す）に列挙したオリゴヌクレオチドとともに培養した実験からのサイトカイン産生および細胞増殖結果を示す。オリゴヌクレオチドを、1.0  $\mu$ g/mlまたは10  $\mu$ g/mlの最終濃度で使用した。少な

くとも1つのISSを含むオリゴヌクレオチドでの細胞の処理は、細胞からのIL-6およびIL-12の産生、ならびに細胞増殖の刺激を生じた。修飾されたISSを含むオリゴヌクレオチドは、一般的には、未修飾ISSを含むオリゴヌクレオチドと同程度またはそれ以上に有効であった。ISSを含まないオリゴヌクレオチドは、IL-6もしくはIL-12産生または細胞増殖を刺激し得なかった。この実験において使用した全てのオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格を含んだ。

### 実施例 3

#### アジュバント共投与での免疫応答の相乗作用

抗原に対する免疫応答における抗原およびISSでのアジュバント共投与の効果を、アジュバントとして水酸化アルミニウム（ミョウバン）および水中油エマルジョンアジュバントとしてMF59を用いて実験した。1  $\mu$ g AgE（Ambalとしても公知、短ブタクサの主要なアレルギー成分）を含む組成物を、マウスに、0、2、および4週で、皮内注射した。使用した抗原組成物を表3に列挙する。オリゴヌクレオチド2（配列番号2）を、示される組成物において使用した。

表 3

AgE	AgE-オリゴ2 結合体
AgE + オリゴ2 結合体 (等価物)	AgE + オリゴ2 結合体 (50 $\mu$ g オリゴ2)
AgE および MF59	AgE-オリゴ2 結合体 および MF59
AgE および ミョウバン (25 $\mu$ g)	AgE-オリゴ2 結合体 および ミョウバン (25 $\mu$ g)
AgE および ミョウバン (800 $\mu$ g)	

マウスの血清における抗AgE抗体の量を、0日および2、4、および6週で測定した。抗AgE IgG1および抗AgE IgG2a抗体アッセイを、マイクロタイタープレート上の被膜抗原として本来のAgEワクチンを使用し、Razら（1996）に記載される様に、ELISA試験によって行った。抗AgE IgEを、標準的なラジオイムノアッセイ技術によって測定した。これらの実験の結果を、図7～9に示す。

図7に示されるように、抗原単独またはISSとの混合物の投与は、ほとんど抗AgE IgG2a産生を生じなかったのに対して、抗原ISS結合体の投与は、優位なレベルの抗AgE IgG2a抗体を産生した。抗原ISS結合体およびアジュバントMF59の同時

の共投与は、抗原ISS結合体単独の投与から得られたものと比較して、抗AgE IgG 2a抗体産生において約2倍の増加を生じた。従って、近位の関係（例えば、結合体の形態）における抗原およびISSの投与、またはMF59および抗原ISSの共投与は、それぞれ、抗原または抗原ISS結合体によって生成される一次Th1型免疫応答を増加し、このことはISSが独立したアジュバント活性を有することを示した。

ミョウバンおよび抗原ISS結合体の共投与の結果としての抗AgE IgG2a産生はまた、抗原およびミョウバンの共投与の結果と比較して、ISSに関連する独立したアジュバント活性を示す（図9）。

CpG含有オリゴヌクレオチドは、最近、抗原および不完全フロイントアジュバント（IFA）とともに投与された場合、IFAを用いる抗原単独の投与に対し生成されるTh2型応答と比較して、Th1型免疫応答を促進することが示された。Chuら（1997）J. Exp. Med. 10:1623-1631。この研究において、オリゴヌクレオチドはいつも、IFAの存在下で投与された。この研究は、CpG含有オリゴヌクレオチドの抗原およびアジュバントとの共投与がTh2型応答からTh1型応答への免疫応答におけるシフトを生じ得ることを示すが、本発明において示されるような、オリゴヌクレオチドの独立したアジュバント活性を示す実験は、全く行われなかった。

#### 実施例 4

##### ISSを含む組成物の投与後の宿主におけるTh1型応答の選択的誘導

本明細書中に記載したように、Th1型免疫応答は、特定のサイトカイン（例えば、IFN- $\gamma$ ）の産生に関連し、そしてCTLの産生を生じる。

Th1型免疫応答が、本発明のISSオリゴヌクレオチド組成物を受けるマウスにおいて産生されるかどうかを決定するために、マウスを、種々の組成物中の $\beta$ -ガ

ラクトシダーゼ（ $\beta$ -Gal）タンパク質で、ISSオリゴヌクレオチドの共投与を伴うかまたは伴わずに免疫化した。使用した組成物は、1または10  $\mu$ gの $\beta$ -Galを含み、そして表4に列挙する。

表4

$\beta$ -Gal	$\beta$ -Gal-オリゴ2 結合体
$\beta$ -Gal-オリゴ2 混合液 (等価物)	$\beta$ -Gal-オリゴ2 混合液 (50 $\mu$ g オリゴ2)
1 $\mu$ g $\beta$ -Gal/ ミュウバン	

BALB/cマウスを、上に示される量および組成で皮内注射し、そして注射2週間後に屠殺した。抗原依存性CTL応答およびサイトカイン分泌プロファイルを、インビトロで試験した。CTL応答を、Satoら(1996)に記載されるように測定した。サイトカイン分泌を、ELISA試験によって測定した。未処置のマウスもまた、実験に含めた。結果を、図10～13に示した。

免疫応答の初期の時点(組成物の投与後2週間)で、CTL活性を、ISSと結合体化した抗原10  $\mu$ gを受けるマウスの細胞から見出した(図10)。ISSと結合体化した $\beta$ Gal 1  $\mu$ gを受けるマウス由来の脾細胞は、ISSと結合体化した $\beta$ Gal 10  $\mu$ gを受けるマウスのものと匹敵するCTL活性の量を生成した(図11)。IFN- $\gamma$  (Th1に偏ったサイトカイン)は、ISSと結合体化した $\beta$ Galを受けたマウスの細胞からのみ産生された(図12)。これらのマウスからの細胞はまた、IL-10 (Th2に偏ったサイトカイン)を産生した(図13)。

#### 実施例5

##### 抗原ISS組成物に対する霊長類免疫応答

インビトロおよびマウス実験を超えてISSの免疫調節活性を実験するために、ISSの存在下での免疫応答を霊長類において実験する。

カニクイザルを、10  $\mu$ gのB型肝炎表面抗原(HBsAg)単独、または50  $\mu$ gのオリゴヌクレオチド2(配列番号2)もしくは500  $\mu$ gのオリゴヌクレオチド2のいずれかと混合して、0、4、および8週で、筋肉内免疫化した。HBsAgに対する

抗体応答を、Abbott Laboratories AUSABキットを用いて、4週(最初の注射の4週後)、5週(最初の注射の5週後および第2の注射の1週後)、および8週(最初の注射の8週後および第2の注射の4週後)で測定した。結果を、図14、15、および16に示す。実験した各時点で、抗原のISSとの共投与は、抗原に対するより大きな抗体応答を一般に生じた。従って、霊長類において、ISSは、共投

与した抗原に対する免疫応答の生成において、アジュバント様活性を提供する。

カニクイザルを用いる実験において、ISSおよび抗原を、混合物として投与した。霊長類におけるISS抗原結合体の免疫調節活性を決定するために、ヒヒを、ISS-Ambal結合体を含む組成物で注射した。適切な間隔で、抗原特異的免疫応答を、本明細書中に記載したように決定した。例えば、抗原特異的血清抗体レベルを決定し、そして免疫化前の血清におけるそのようなレベルと比較する。

#### 実施例6

##### 免疫刺激オリゴヌクレオチドについてのスクリーニング方法

潜在的なISS活性を有するオリゴヌクレオチドを同定するために、細胞株を、試験すべきオリゴヌクレオチドで処理し、そして得られたサイトカイン産生が存在する場合に測定する。ISS活性のスクリーニングに使用した細胞株は、マウス細胞株P388D.1またはヒト細胞株90196.Bであり、これらは両方とも、アメリカンタイプカルチャーコレクションより入手可能である。

細胞を、標準的な技術を用いて増殖させ、そして調製する。細胞を、増殖期の間に取り出し、そして2%熱非働化ウシ胎児血清(FCS)、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、および2mM L-グルタミンを補充したRPMI 1640培地で洗浄し、そして10%FCS/RPMI中に、約 $4 \times 10^6$ 細胞/mlで再懸濁した。

細胞培養を、細胞を含む10%FCS/RPMI 100  $\mu$ l中96ウェルのフラットマイクロタイタープレートにおいて、約 $4 \times 10^5$ 細胞/ウェルで三連に設定する（プレーティング後少なくとも1時間静置させた）。試験するオリゴヌクレオチドを10%FCS/RPMIで希釈し、そしてオリゴヌクレオチド希釈物の100  $\mu$ lを、適切なウェルに添加する。一般的には、最終オリゴヌクレオチド濃度は、0.1  $\mu$ g/ml、1.0  $\mu$ g/ml

および10  $\mu$ g/mlを含む。次いで、細胞を、1、2、または3日間インキュベートする。

細胞増殖を測定するために、100  $\mu$ lの上清を、適切な日に各ウェルから採取し、1.0  $\mu$ Mの滴定したチミジンでパルスし、そして一晩インキュベートした。滴定



したチミジンの取り込みを評価するための標準的な方法を使用して、細胞増殖を測定した。

細胞によるサイトカイン産生を、サイトカインに対する市販の抗体を用いて、培養上清のELISAによって測定した。細胞へのオリゴヌクレオチドの添加の48または72時間後の細胞培養上清における2 ng/mlを超えるIFN- $\gamma$  および／またはIL-12の検出は、オリゴヌクレオチドにおけるISS活性の指標である。IFN- $\gamma$  および／またはIL-12の産生は、特に、Th1型ISS免疫応答を誘導する活性の指標である。

。

前述の発明は、理解を明確にする目的ために例示および実施例としていくらか詳細に記載されているが、特定の変化および修飾が実施され得ることは当業者には明らかである。それゆえ、説明および実施例は、添付の請求の範囲によって記載される本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

## 配列表

## (I) 一般的情報：

(i) 出願人：ダイナボックス テクノロジーズ コーポレーション

(ii) 発明の名称：免疫刺激オリゴヌクレオチド、その組成物およびその使用方法

(iii) 配列数：21

(iv) 連絡住所：

(A) 住所：モリソン アンド フェルスター エルエルビー

(B) 番地：ページ ミル ロード 775

(C) 市：パロ アルト

(D) 州：カリフォルニア

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：94304-1018

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：ディスク

(B) コンピューター：IBM 互換用

(C) OS：Windows

(D) ソフトウェア：FastSEQ (Windows Version 2.0b用)

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：PCT/US98/11578

(B) 出願日：1998年6月5日

(C) 分類：

(vii) 先願データ：

(A) 出願番号：US 09/092,329

(B) 出願日：1998年6月5日

(vii) 先願データ：

(A) 出願番号：US 60/048,793

(B) 出願日：1997年6月6日

(viii) 代理人/事務所情報：

(A) 名称：シフ, マイケル ジェイ.

(B) 登録番号：40,253

(C)照会/記録番号：377882000440

(ix)通信情報：

(A)電話：650-813-5600

(B)テレファックス：650-494-0792

(C)テレックス：706141

(2)配列番号1の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：22 塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号1：

TGACCGTGAA CGTTCGAGAT GA

22

(2)配列番号2の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：22 塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号2：

TGACTGTGAA CGTTCGAGAT GA

22

(2)配列番号3の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：22 塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(xi)配列：配列番号3：

TGACTGTGAA GGTAGAGAT GA

22

(2)配列番号4の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：23 塩基対

(B)型：核酸

- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状
- (xi) 配列：配列番号4：

TCATCTCGAA CGTTCACAG TCA

23

- (2) 配列番号5の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：22 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

- (xi) 配列：配列番号5：

TCATCTCGAA CGTTCACGGT CA

22

- (2) 配列番号6の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：22 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

- (xi) 配列：配列番号6：

TGACTGTGAA CGTTCAGAT GA

22

- (2) 配列番号7の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：26 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

- (xi) 配列：配列番号7：

TCCATAACGT TCGCCTAACG TTCGTC

26

- (2) 配列番号8の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：22 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 鎖の数：一本鎖

- (D) トポロジー：直鎖状  
(xi) 配列：配列番号 8：

TGACTGTGAA CGTTAGCGAT GA

22

- (2) 配列番号 9 の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：22 塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状

- (xi) 配列：配列番号 9：

TGACTGTGAA CGTTAGACGT GA

22

- (2) 配列番号 10 の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：21 塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状

- (xi) 配列：配列番号 10：

TGACGTGAAC GTTAGAGATG A

21

- (2) 配列番号 11 の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：23 塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状

- (xi) 配列：配列番号 11：

TGACTCGTGA ACGTTAGAGA TGA

23

- (2) 配列番号 12 の情報：

- (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：22 塩基対  
(B) 型：核酸  
(C) 鎖の数：一本鎖  
(D) トポロジー：直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基

(B) 存在位置: 11

(C) 他の情報: 5-プロモシトシン

## (xi) 配列: 配列番号 1 2:

TGACTGTGAA NGTTCCAGAT GA

22

## (2) 配列番号 1 3 の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号 1 3:

TGACTGTGAA GCTTAGAGAT GA

22

## (2) 配列番号 1 4 の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号 1 4:

TCACTCTCTT CCTTACTCTT CT

22

## (2) 配列番号 1 5 の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 22 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基

(B) 存在位置: 11

(C) 他の情報: 5-プロモシトシン

## (xi) 配列: 配列番号 1 5:

TGACTGTGAA NGTTGAGAT GA

22

## (2) 配列番号 16 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 22 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 11
- (C) 他の情報: 5-プロモシトシン
- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 15
- (C) 他の情報: 5-プロモシトシン

## (xi) 配列: 配列番号 16:

TGACTGTGAA NGTTNGAGAT GA

22

## (2) 配列番号 17 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 8
- (C) 他の情報: 5-プロモシトシン

## (xi) 配列: 配列番号 17:

TCCATGANGT TCGTGATCGT

20

## (2) 配列番号 18 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (xi) 配列: 配列番号 18:

TCCATAANGT TCCTGATGCT

20

## (2) 配列番号19の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 20 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 8
- (C) 他の情報: 5-プロモシトシン

## (xi) 配列: 配列番号19:

TCCATAANGT TCGTGATGCT

20

## (2) 配列番号20の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 24 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 8
- (C) 他の情報: 5-プロモシトシン

## (xi) 配列: 配列番号20:

TCCATAANGT TCGCCTAACG TTCG

24

## (2) 配列番号21の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 24 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 8
- (C) 他の情報: 5-プロモシトシン
- (A) 特徴を表わす記号: : 修復された塩基
- (B) 存在位置: 19

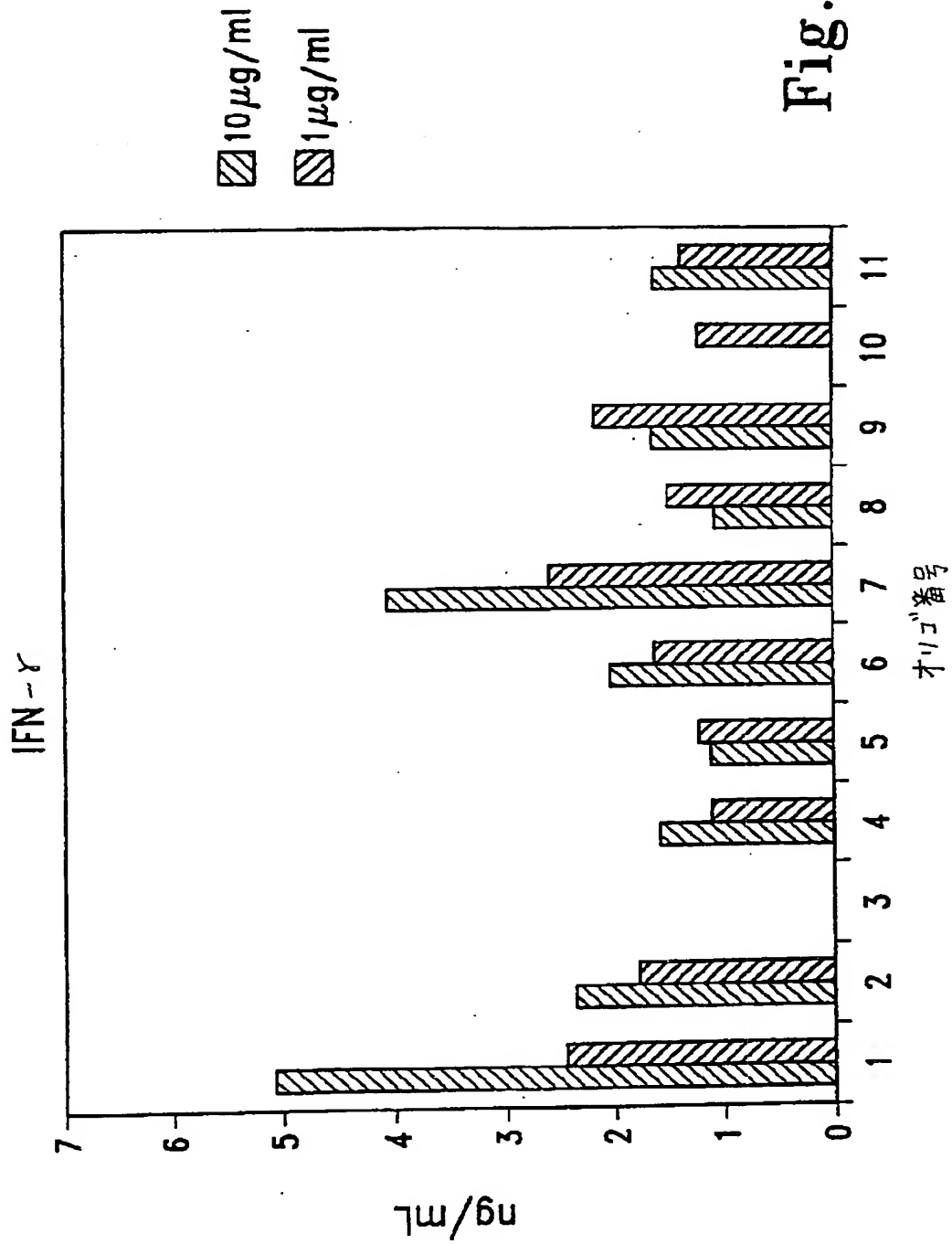


(C)他の情報：5-プロモシトシン  
(xi)配列：配列番号21：

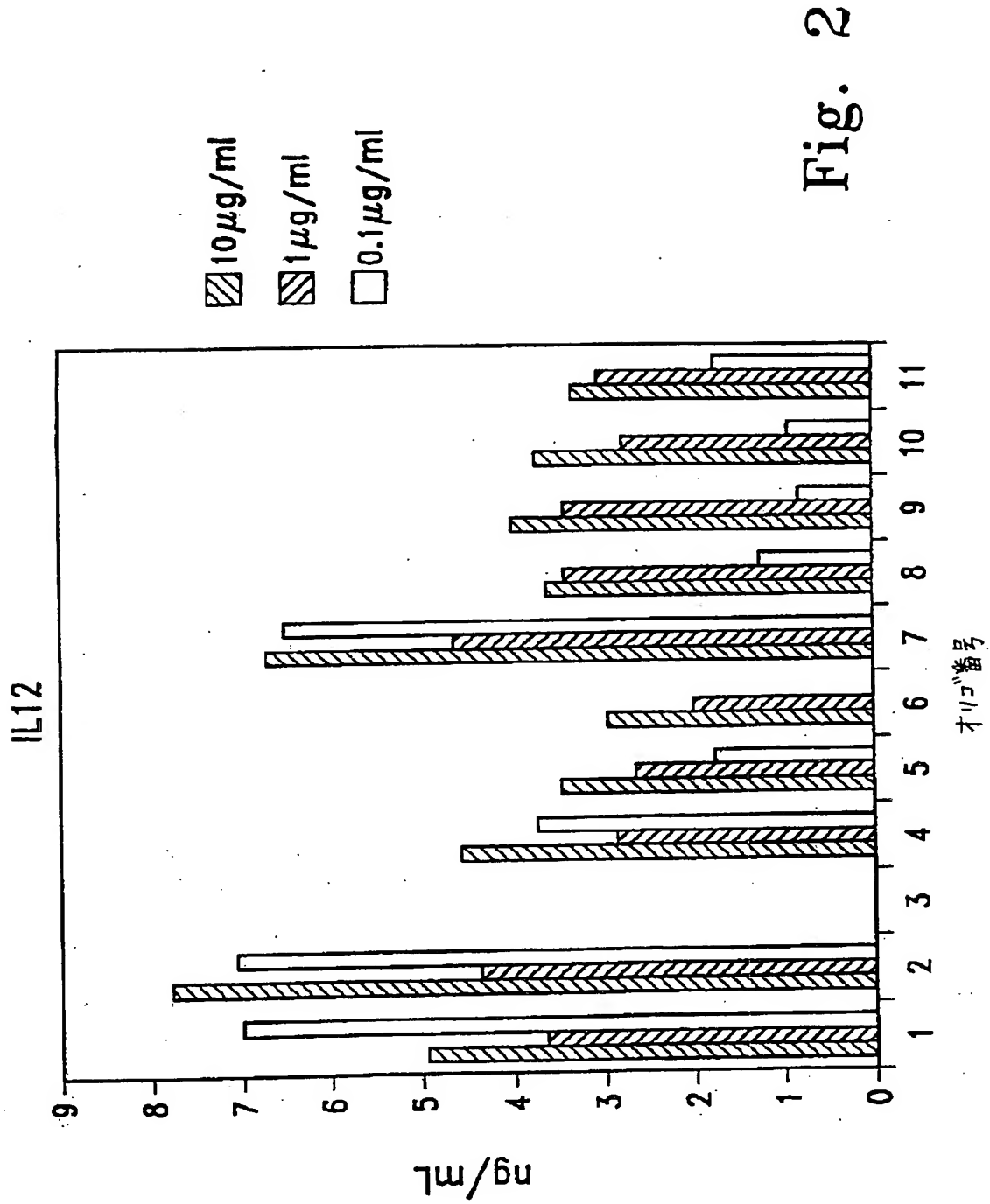
24

TCCATAANGT TCGCCTAANG TTCG

【図1】



【図2】



【図3】

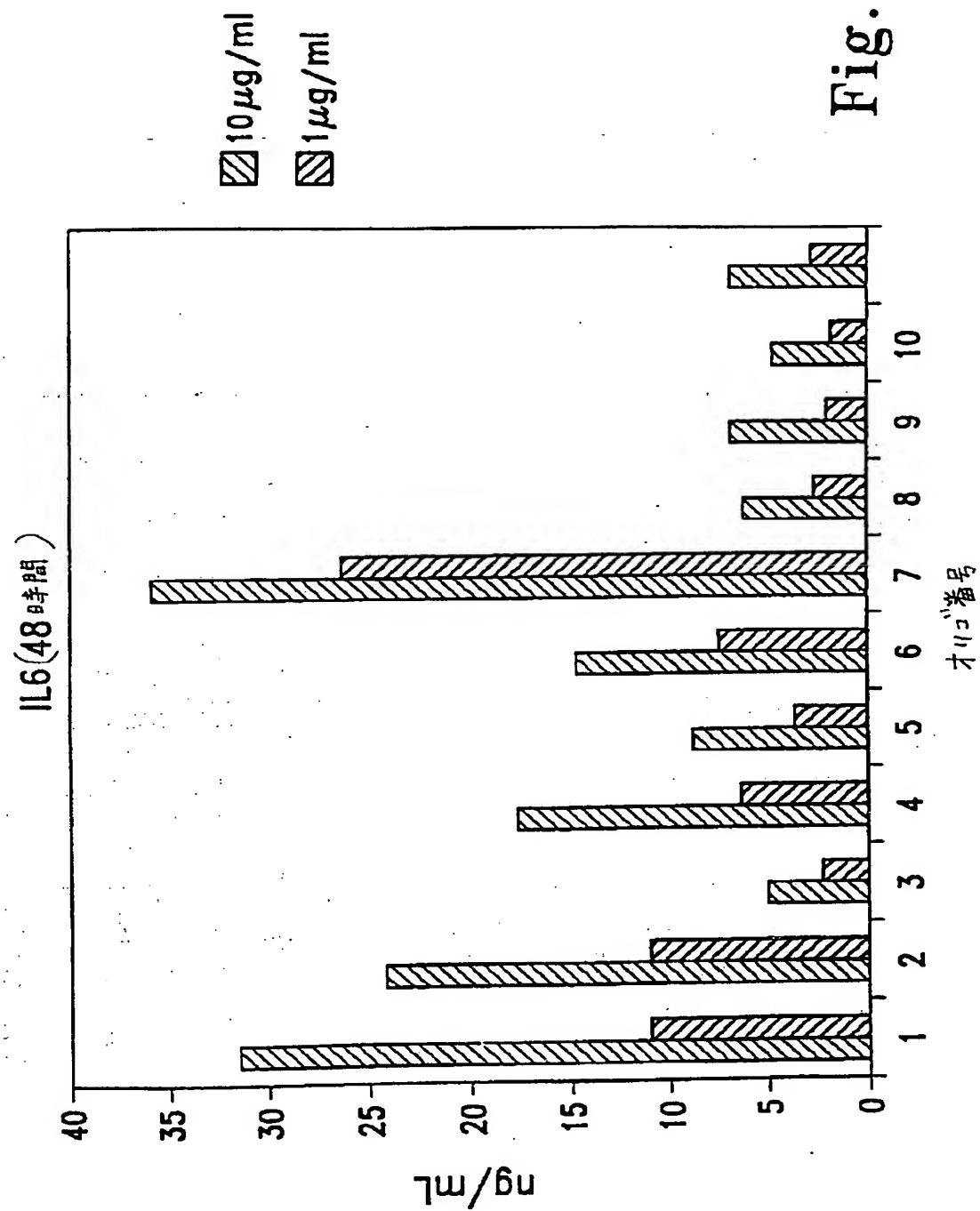


Fig. 3

【図4】

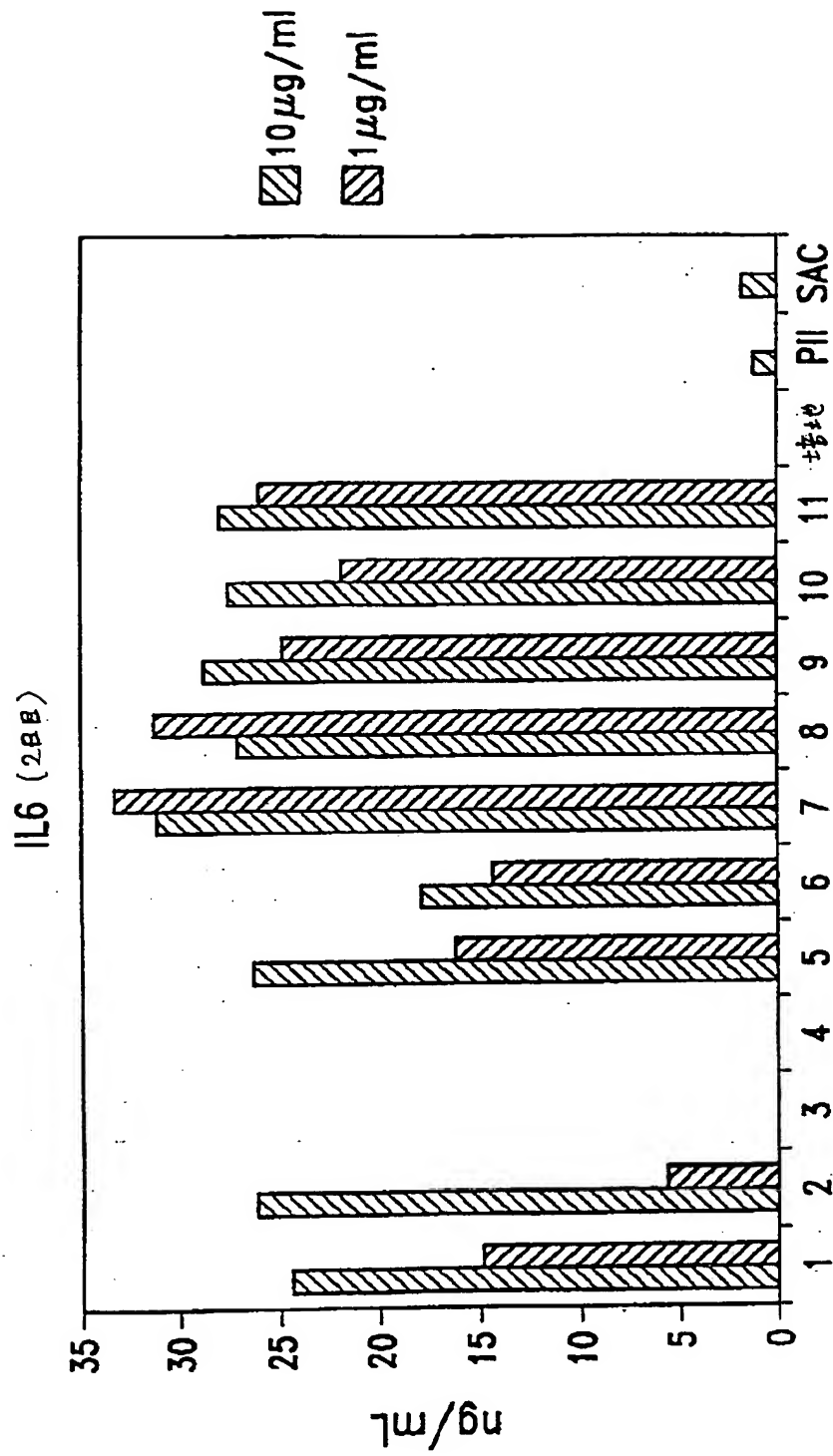


Fig. 4

【図5】

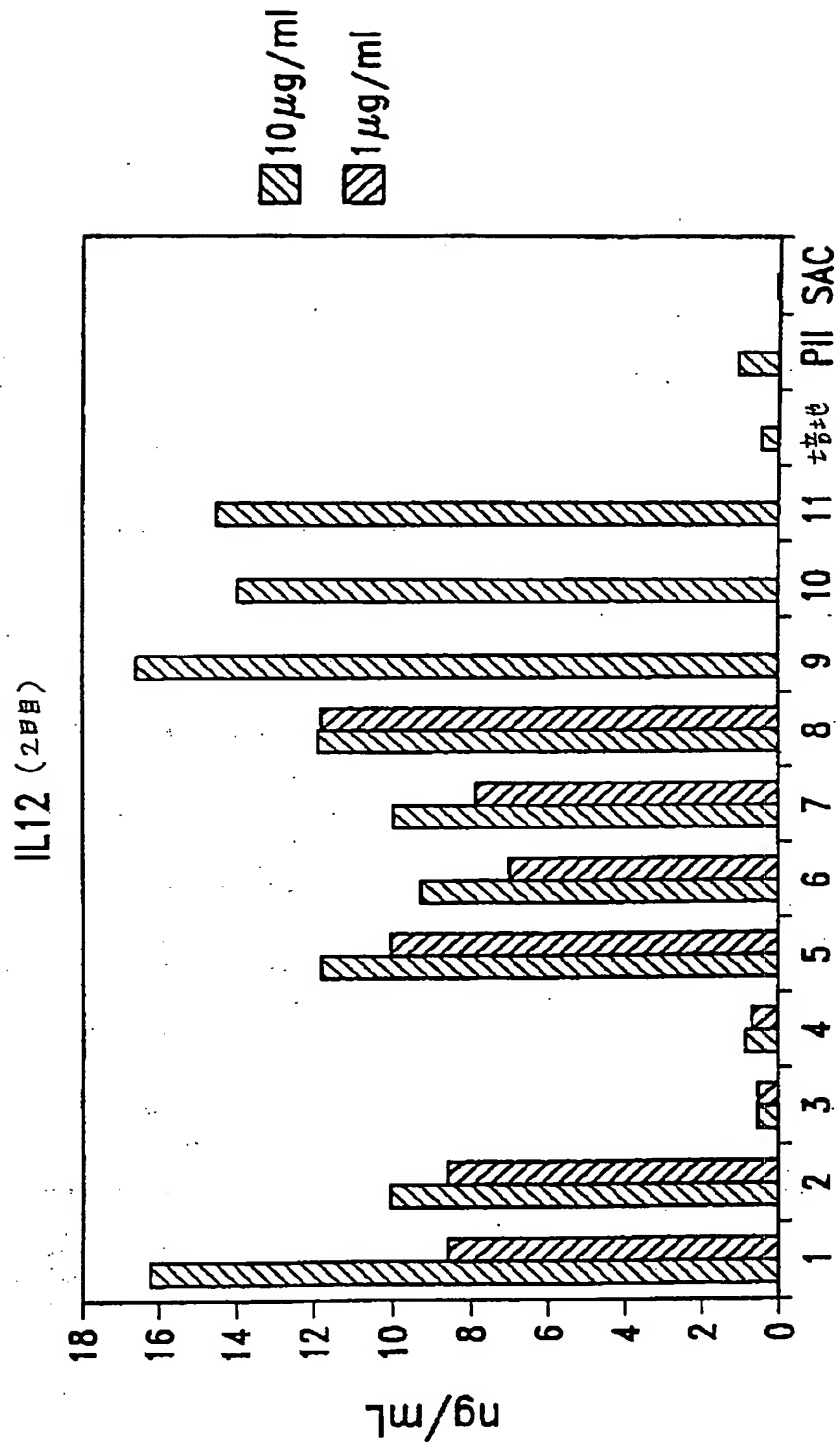


Fig. 5

【图6】

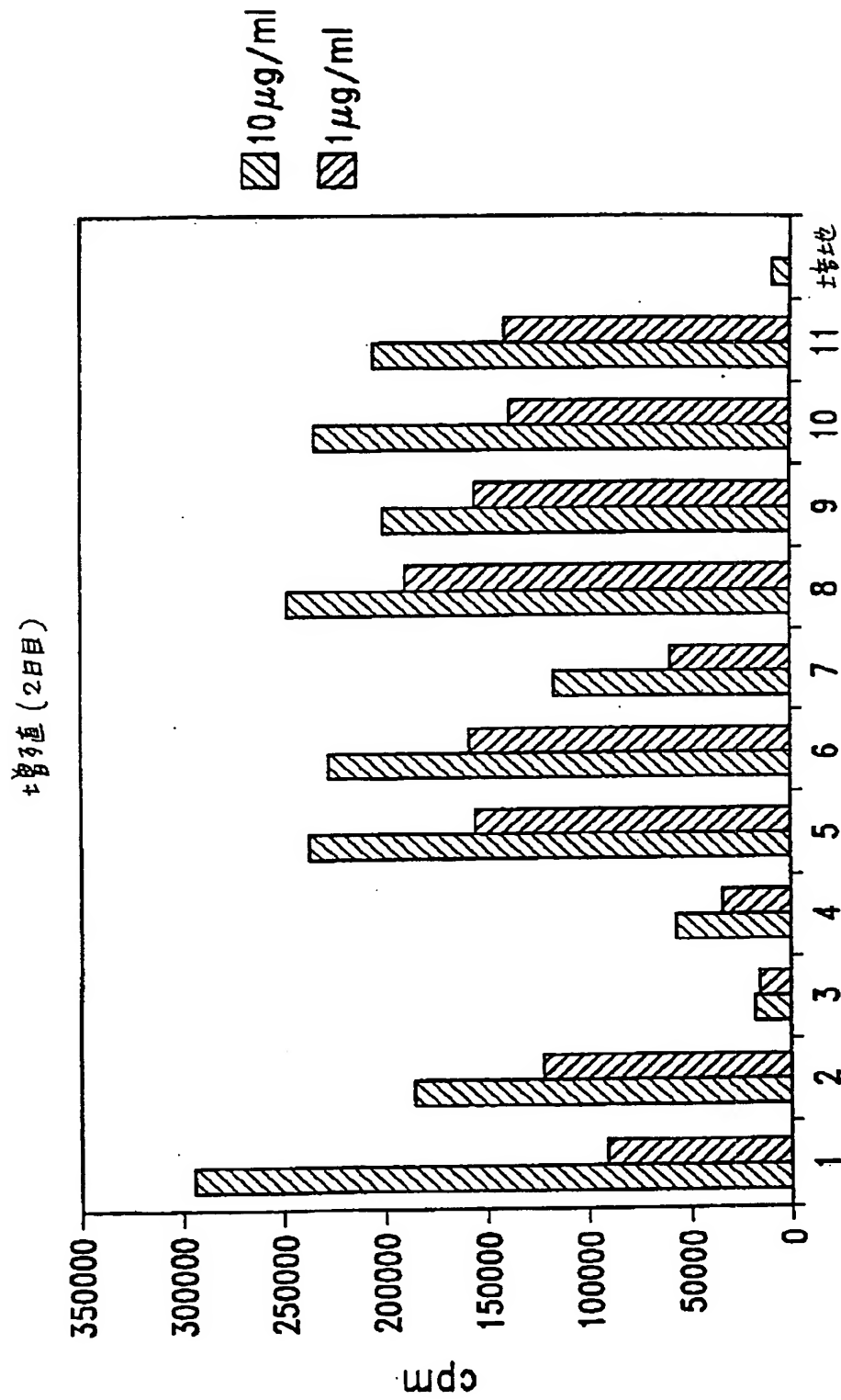


Fig. 6

【図7】

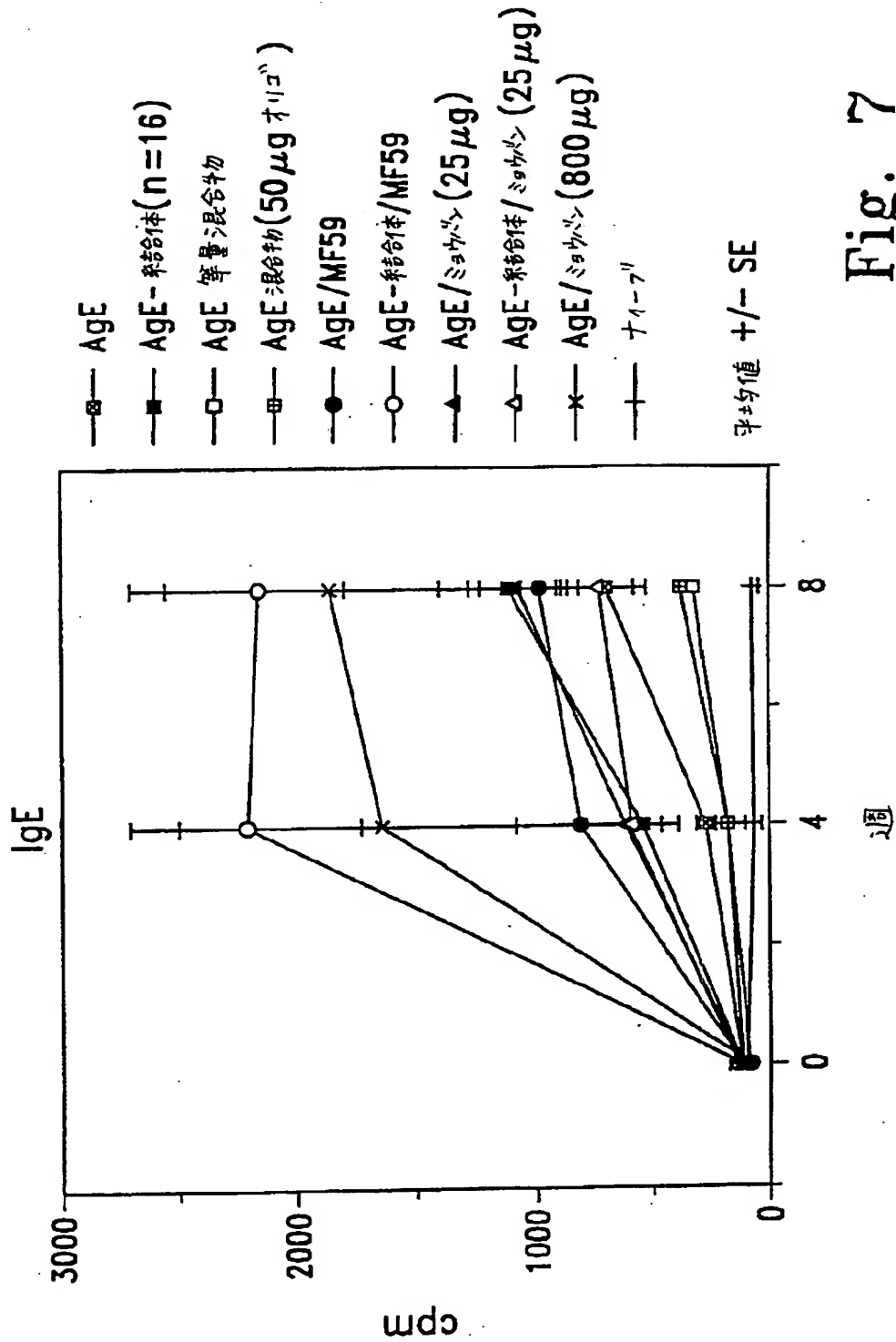


Fig. 7



【図8】

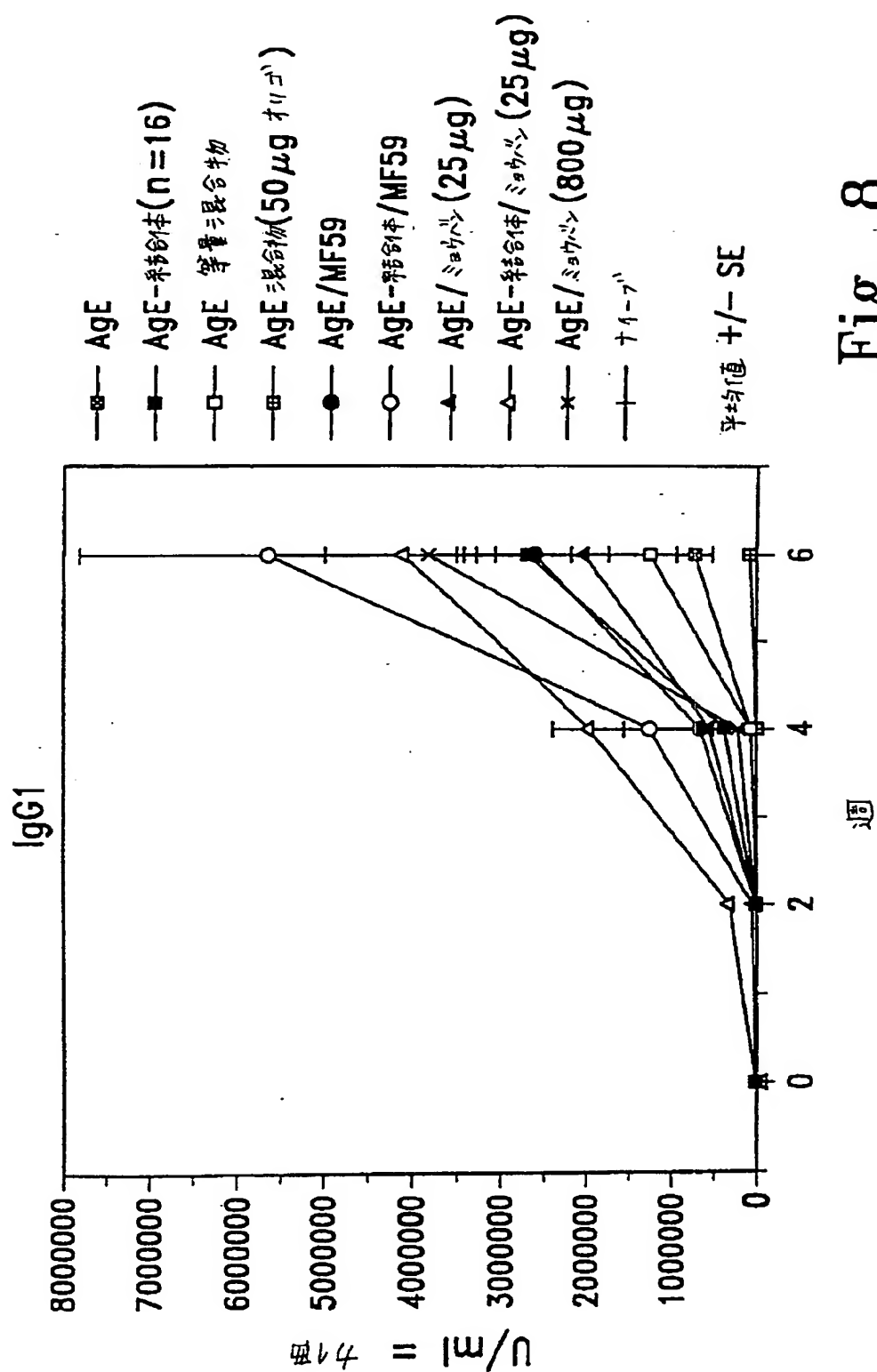


Fig. 8

【図9】

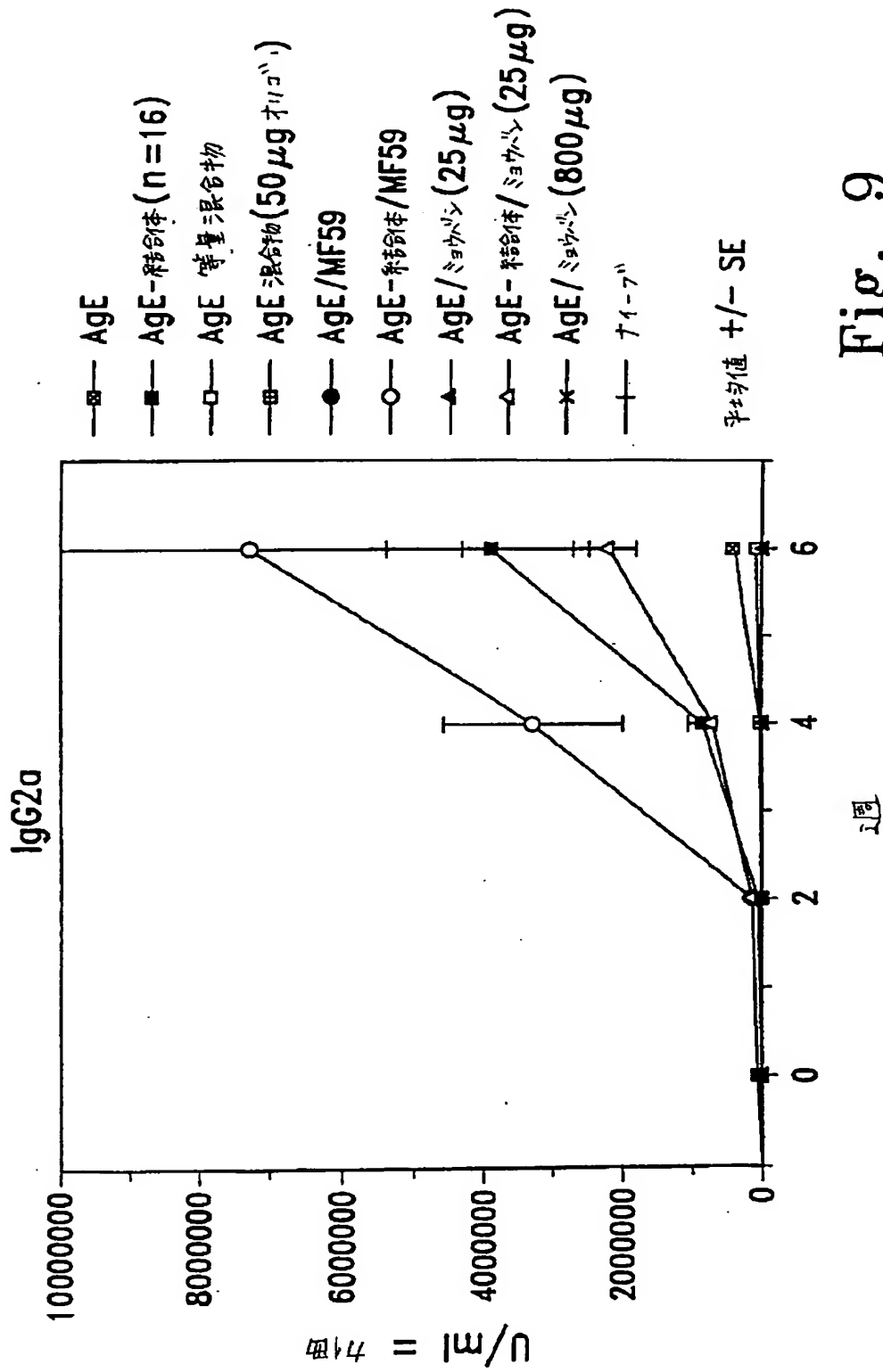


Fig. 9

【図10】

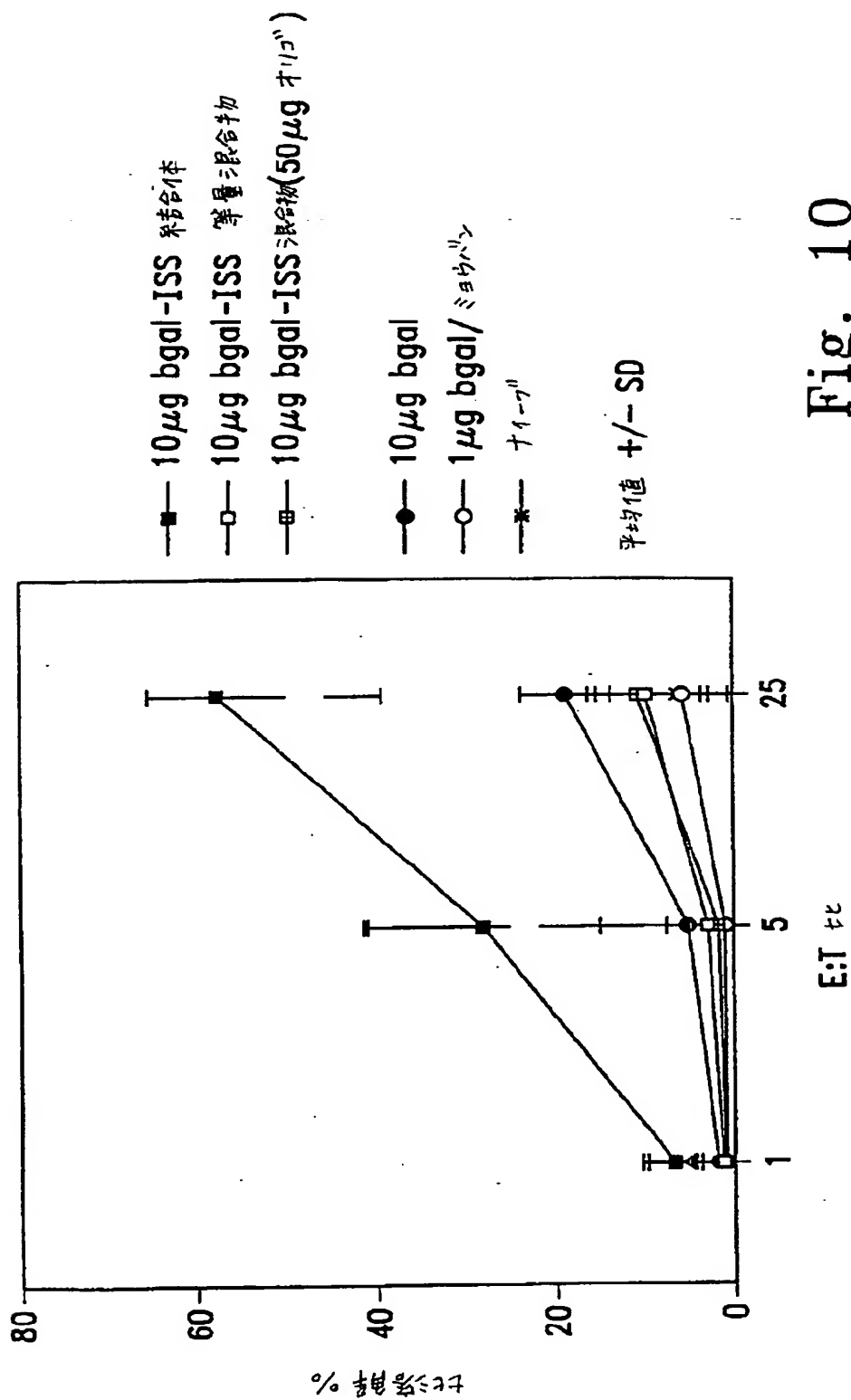


Fig. 10

【図11】

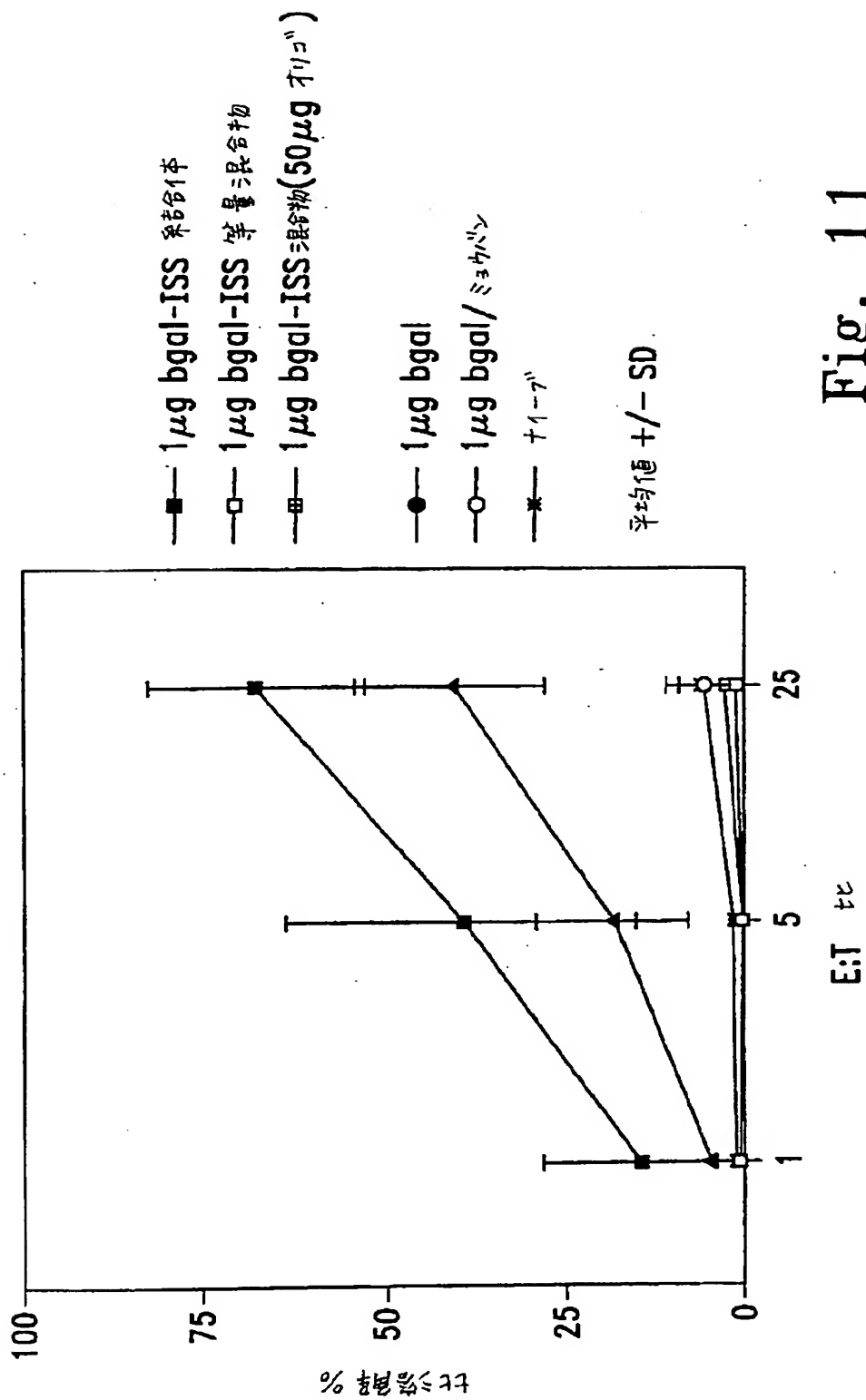


Fig. 11

【図12】

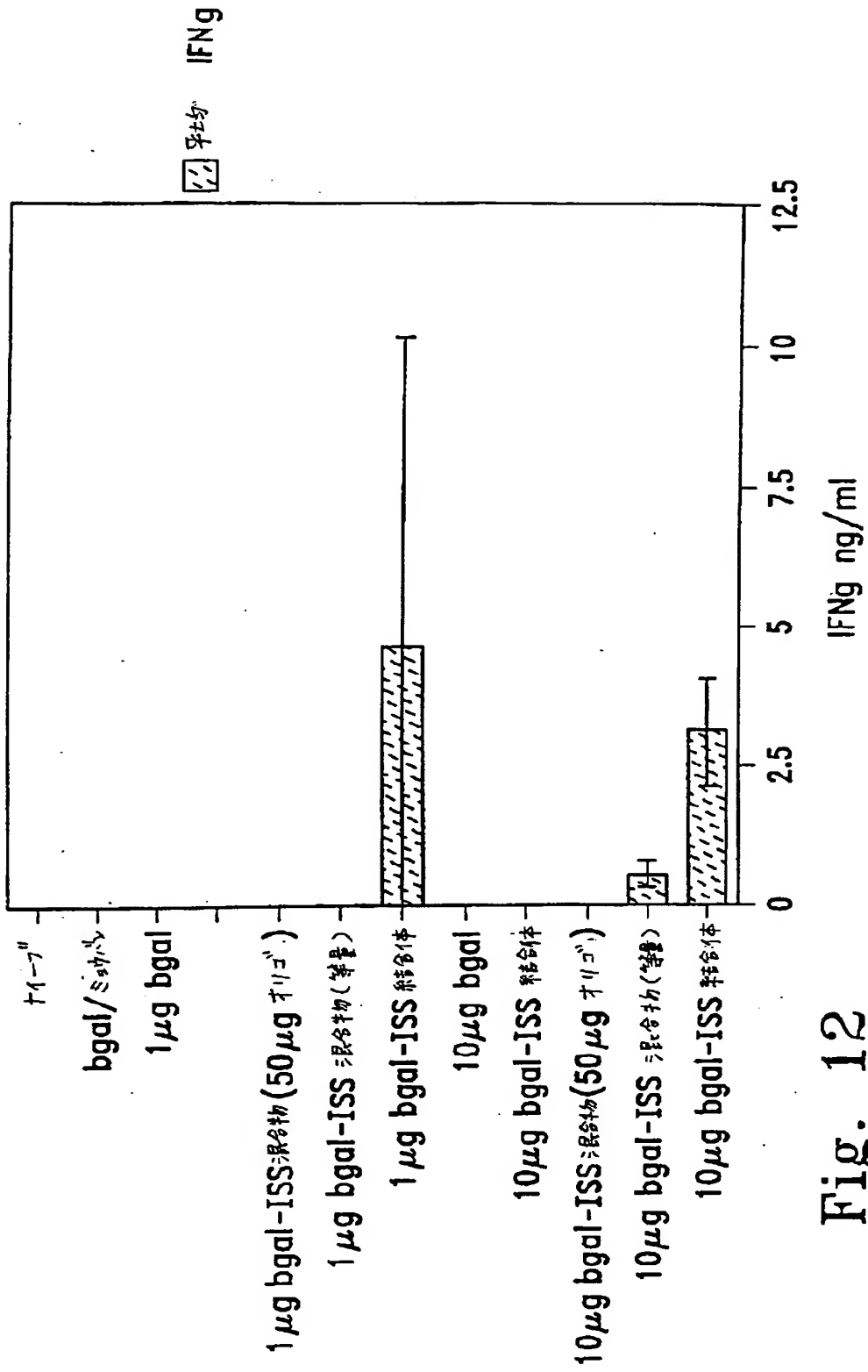


Fig. 12

【図13】

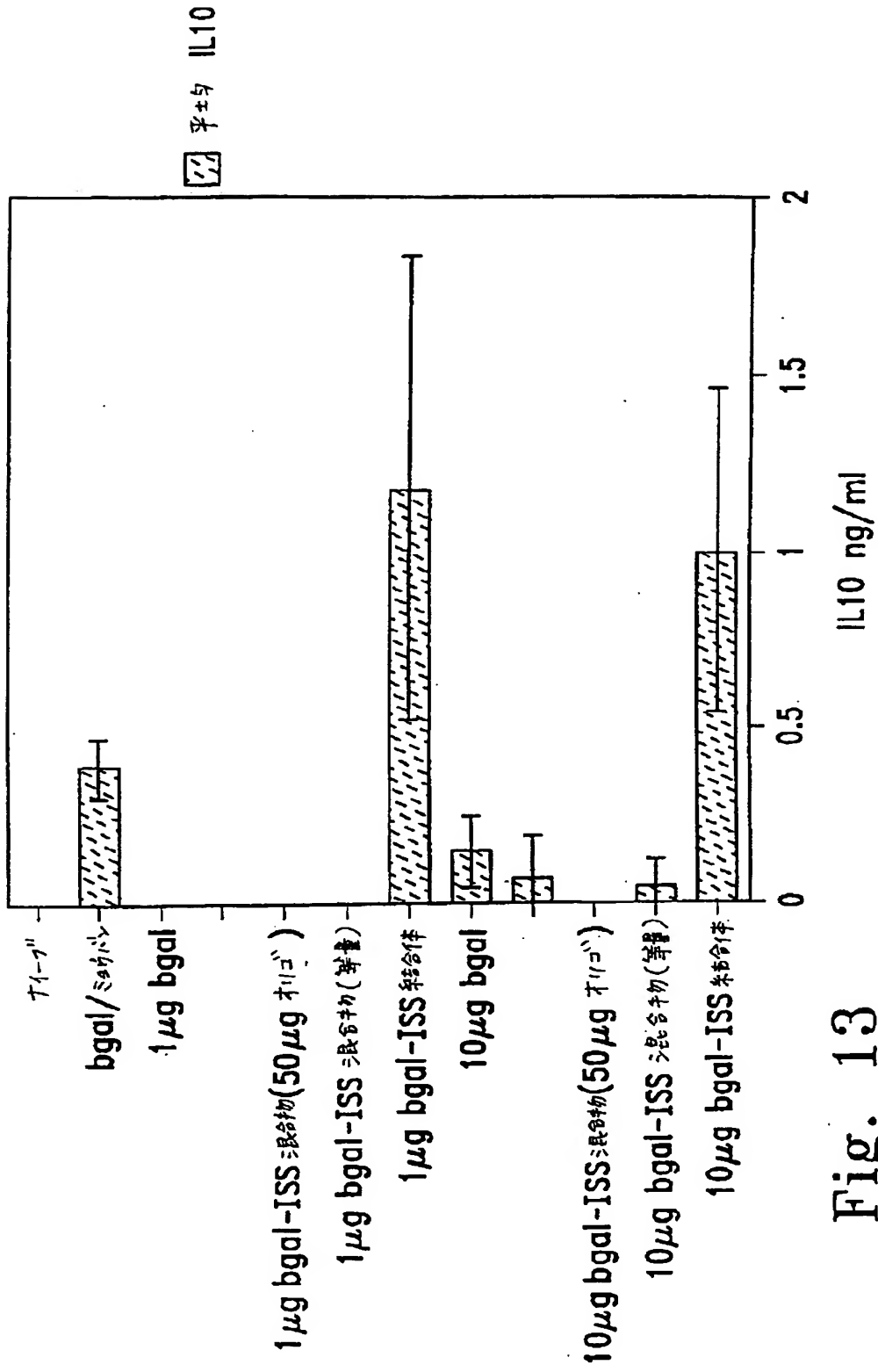


Fig. 13

【図14】

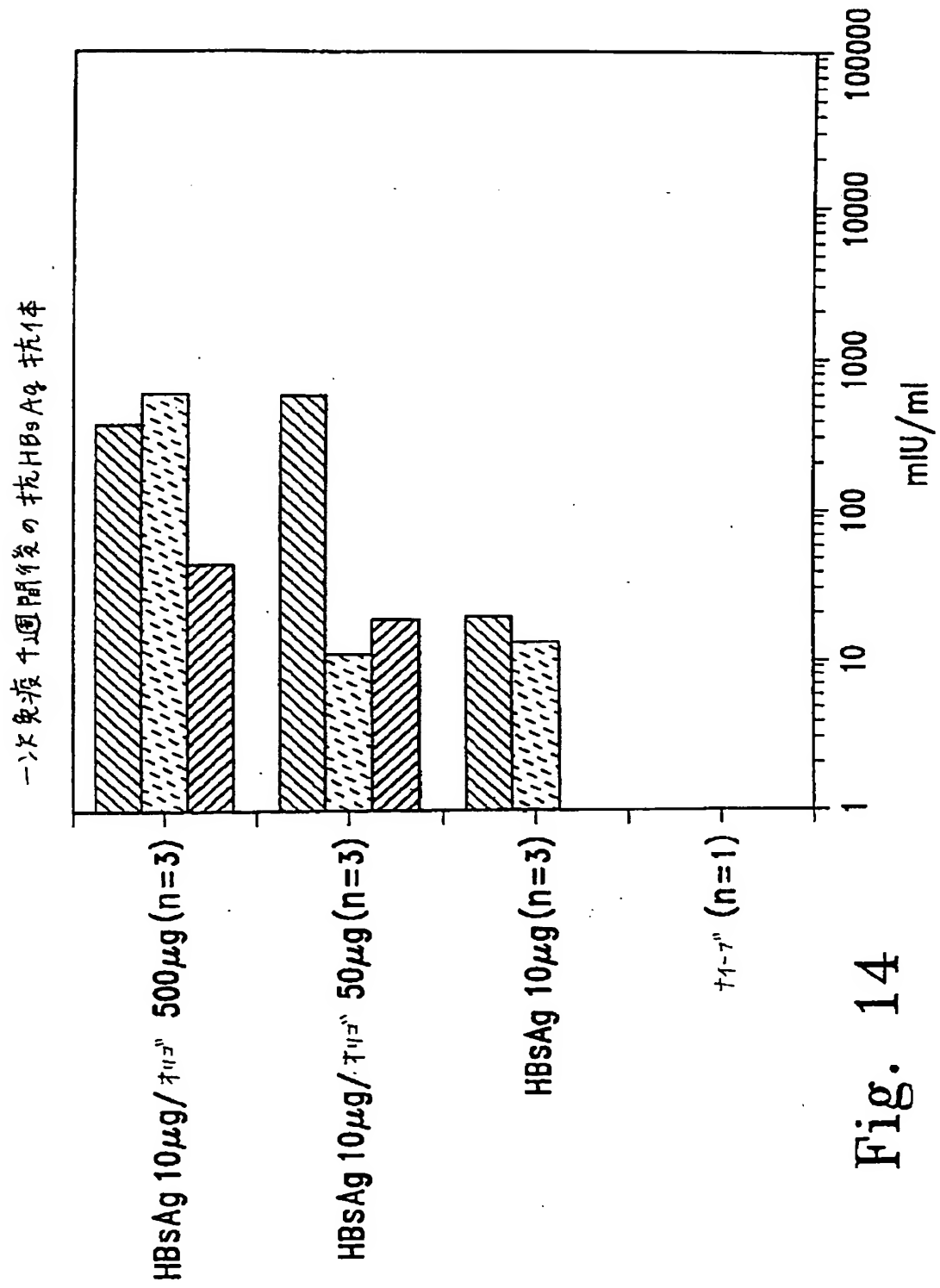


Fig. 14

【図15】

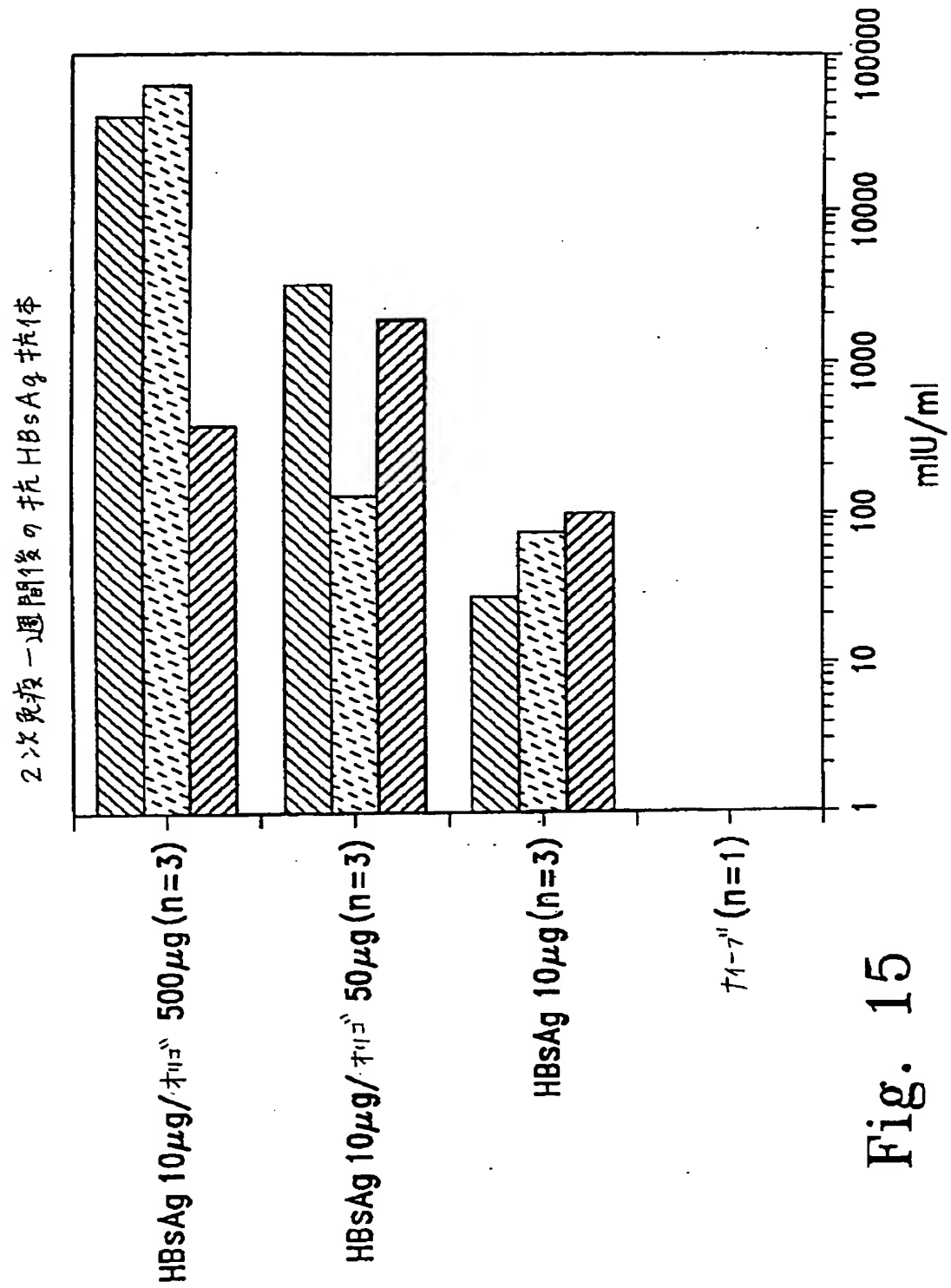


Fig. 15



【図16】

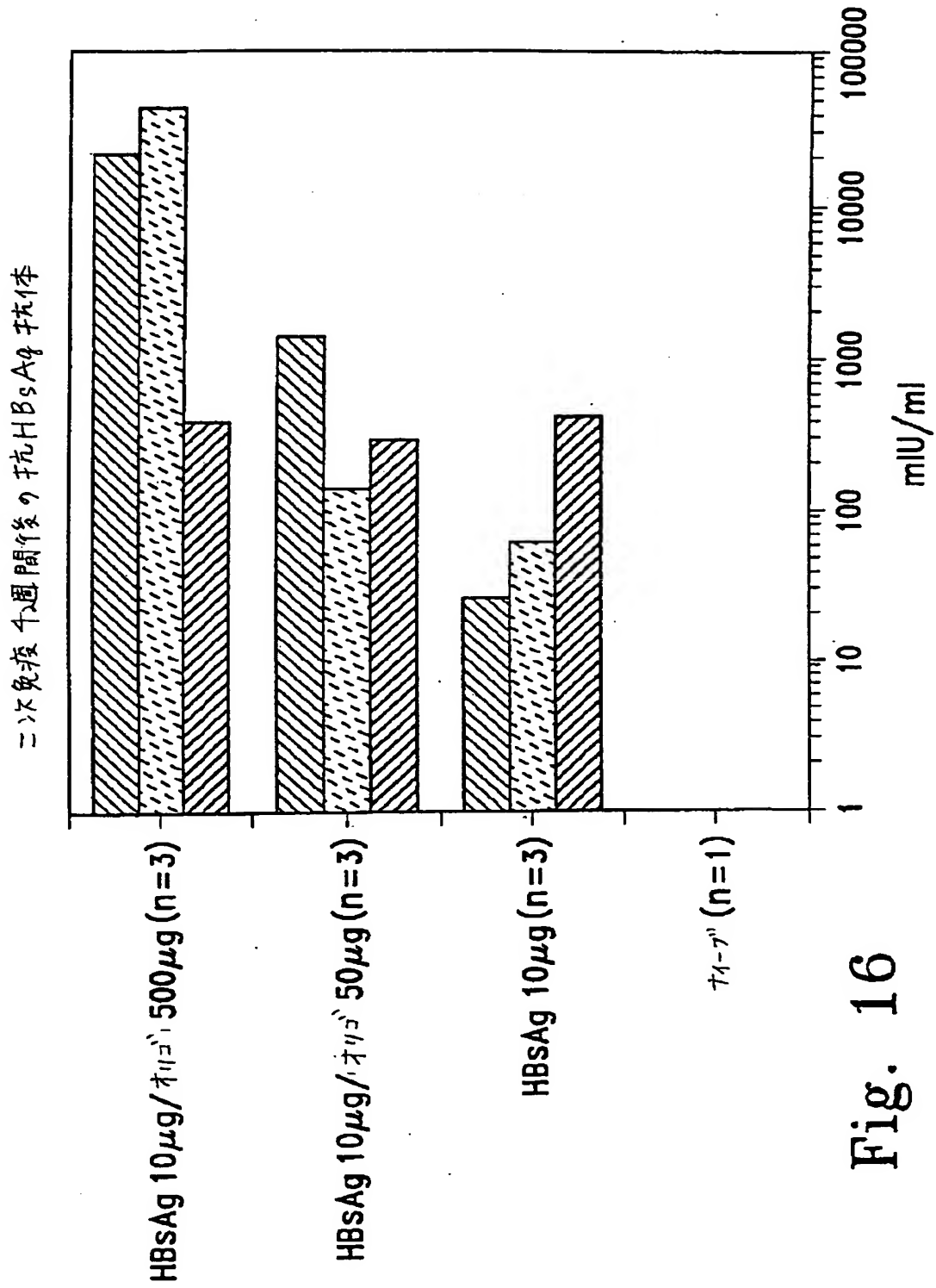


Fig. 16

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 98/11578		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H21/00 A61K31/70		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRIEG A M ET AL: "CPG MOTIFS IN BACTERIAL DNA TRIGGER DIRECT B-CELL ACTIVATION" NATURE, vol. 374, 6 April 1995, pages 546-549, XP000197060	1,56, 60-63
A	see page 548, column 1; table 2	2,3,10, 11,16, 17,67,68
X	SATO Y ET AL: "IMMUNOSTIMULATORY DNA SEQUENCES NECESSARY FOR EFFECTIVE INTRADERMAL GENE IMMUNIZATION" SCIENCE, vol. 273, 19 July 1996, pages 352-354, XP002058357 see abstract; page 354, note 13, first sequence	1,3,4,56
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 March 1999		Date of mailing of the international search report 06/04/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 631 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scott, J

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/11578

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 26204 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 5 October 1995 see the whole document	1,56
A	WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 February 1996 see page 15, table 1, compounds 4-4h; page 21, line 10 - page 24, line 20	1,56
A	BALLAS Z K ET AL: "INDUCTION OF NK ACTIVITY IN MURINE AND HUMAN CELLS BY CPG MOTIFS IN OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AND BACTERIAL DNA" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 157, September 1996, pages 1840-1845, XP002058359 see the whole document	1,56
P,X	WO 98 16247 A (CARSON DENNIS A ;RAZ EYAL (US); ROMAN MARK (US); UNIV CALIFORNIA ( ) 23 April 1998 see page 37, lines 9,10, sequence DY1018; examples 2-4, claims 1,2,27,29,54,57,66; page 3, line 2 - page 4, line 11	1,3-5, 25-32, 45-66
P,X	WO 98 18810 A (UNIV IOWA RES FOUND ;KLINE JOEL N (US); KRIEG ARTHUR M (US)) 7 May 1998 see the whole document, but especially, claim 1, claim 18, claim 23, sequence 2	1,2,4, 45,46, 56,59,60
T	NGUYEN H ET AL: "Studies Towards the Design of a Modified GC Base Pair With Stability Similar to that of the AT Base Pair" TETRAHEDRON LETTERS, vol. 38, no. 23, 9 June 1997, page 4083-4086 XP004065032 see the whole document, and especially parts detailing 5-bromo-cytidine	1,2, 10-21
P,A	GRAYSON B LIPFORD ET AL: "Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 27, December 1997, page 3420 3420 XP002077483 see the whole document	1,56

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

national Application No

PCT/US 98/11578

Patent document: cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9526204 A	05-10-1995	US 5663153 A	02-09-1997
		US 5723335 A	03-03-1998
WO 9602555 A	01-02-1996	AU 1912795 A	16-02-1996
		CA 2194761 A	01-02-1996
		EP 0772619 A	14-05-1997
		JP 10506265 T	23-06-1998
WO 9816247 A	23-04-1998	AU 4992197 A	11-05-1998
WO 9818810 A	07-05-1998	AU 5242498 A	22-05-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW			
(72) 発明者 ディナ, ディノ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94618, オークランド, ブエナ ビスタ アベニュー 6140			
(72) 発明者 ラズ, アイル アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014, デル マー, マンゴードライブ 13658			